



CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDOS
DE DOUTORAMENTO E AVANZADOS
DA USC (CIEDUS)

TESIS DE DOCTORADO

Respuesta inmune en rodaballo (*Psetta máxima*) y lenguado (*Solea sp*). Efecto de la vacunación

Cristina María García Carballas

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL
PROGRAMA DE DOCTORADO EN AVANCES EN BIOLOGÍA MICROBIANA E
PARASITARIA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2018



AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Respuesta inmune en rodaballo (*Psetta máxima*) y lenguado
(*Solea* sp). Efecto de la vacunación

Dña. María Ysabel Santos Rodríguez
D. Rafael Seoane Prado

INFORMAN:

Que la presente Tesis, corresponde con el trabajo realizado por Dña. Cristina María García Carballas, ha sido realizada bajo nuestra dirección, y autorizamos su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como directores de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.

En Santiago de Compostela, 30 de juliode 2018.

Fdo: María Ysabel Santos Rodríguez

Fdo: Rafael Seoane Prado



DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

Respuesta inmune en rodaballo (*Psetta máxima*) y lenguado
(*Solea* sp). Efecto de la vacunación

Dña. Cristina María García Carballas

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) *La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) *En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) *La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) *Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

En Santiago de Compostela, 30 de julio de 2018.

Fdo: Cristina María García Carballas





El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido parcialmente financiado por los proyectos de la Xunta de Galicia:

- INCITE 09E2R208063
- PGIDIT 06RMA024E
- PGIDIT 07MMA012CT
- PGIDIT 07MMA002E
- PGIDIT08MMA011200PR



AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha sido sin duda “mi parto” más largo y doloroso, pero con ella cierro una etapa de mi vida que tenía abierta.

Al sentarme a escribir estos agradecimientos, y con la realización de esta tesis me he dado cuenta de que tengo mucha suerte, que siempre he estado rodeada de personas mágicas, de esas que disfrazadas de gente “normal” están siempre a tu lado cuando las necesitas.

No sería justa si no empezara agradeciendo a mis directores el esfuerzo realizado y las muchas horas invertidas en esta tesis. En primer lugar gracias a Ysabel Santos y su familia (daños colaterales causados por esta tesis). Gracias Ysa por empujarme a su realización y porque sin ti ahora mismo no estaría escribiendo éstos agradecimientos, pues gran parte de esta tesis es también parte de tu esfuerzo. Recordaré con cariño las discusiones hasta la saciedad, las noches en vela, los agobios y las correcciones en el salón de tu casa. Gracias también a mi otro director “el jefe”, Rafael Seoane quien siempre estaba ahí cuando lo llamaba, poniendo una nota cuerda, Gracias “Petel” por tu opinión imparcial, tus rápidas correcciones y sobre todo por tu cordura y tu serenidad en muchos momentos que hacía falta.

Gracias a las empresas Pescanova y Stolt Sea Farm por proporcionarme los especímenes y las instalaciones donde realizar mis estudios. Gracias a Ana Riaza al frente del equipo de “las niñas de Stolt” que siempre me trataron como una más y con las que acabé compartiendo ratos de ocio y amistad.

También quiero agradecer a la profesora Ángeles Muñoz, su sonrisa y serenidad. Gracias por ofrecerme siempre palabras reconfortantes y de ánimo cuando no veía la luz al final del túnel.

Gracias también a tantos compañeros que dejé por el camino, en especial a Sonia con la que compartí tantos días de mucho trabajo y risas, que bien nos lo pasamos, “juventud divino tesoro...”, a Ahmed gracias por iniciarme en el mundo de la citometría, a Maxi por enseñarme lo importante que es tener todos los datos ordenados, a Nai y Paula por ayudarme en todo y convertirme en parte de las “micro-sisters” y por la poca fé que depositasteis en mí y en mi tesis, pues gracias a ella y mi orgullo la acabé (que ganas de enseñárosla y celebrarlo).

Gracias a Nancy, Clara y Yoli, por acogerme, animarme y por la pulguita de jamón diaria, ánimo chicas... se puede.

A Yasmina, gracias por aguantar todos mis agobios, mis llores, mis quejas, y gracias por seguir cogiéndome el teléfono a pesar de todo.

Y para el final, y no por ello menos importante dejo a mi familia a quién dedico esta tesis doctoral, GRACIAS.

Gracias a mis abuelos que se quedaron por el camino sin ver el resultado final, pero que sé que me miran desde lo más alto orgullosos.

Gracias a mis padres porque sin ellos no sería lo que soy, que me enseñaron que no todo en la vida se aprende en los libros. Mamá, GRACIAS por ser madre, abuela, cuidadora, enfermera, cocinera, payaso, amiga y todo para mis hijos, y gracias porque nunca me reprochaste y nunca te oí decir lo cansada que estabas ni lo mal que te encontrabas.

Gracias Julio, porque nunca me reprochaste y siempre me apoyaste hasta el final animándome en todo momento y depositando toda tu confianza en mí, siendo el bastón que me sustentó y el viento que me impulsó.

Gracias a mis niños, Quique y Lucas, porque con lo pequeños que sois entendíais que mamá tenía que trabajar, Gracias pequeños por enseñarme las prioridades de la vida, y a diferenciar que la vida se divide entre cosas importantes y tonterías.



RESUMEN

La acuicultura es uno de los sectores que ha experimentado mayor crecimiento en los últimos años. La intensificación en la producción acuícola se ha visto acompañada de la aparición de problemas patológicos, causando pérdidas económicas significativas para la industria. El desarrollo de métodos eficaces de prevención y control de enfermedades infecciosas requiere la identificación de los agentes etiológicos y el conocimiento de su efecto sobre el sistema inmunitario de los peces. En este estudio se han identificado las principales bacterias causantes de mortalidad en rodaballos y lenguados cultivados en piscifactorías del Noroeste de España (Galicia) y se han estandarizado técnicas basadas en espectrofotometría y citometría de flujo para el análisis de la respuesta inmunitaria innata. Además, se han analizado el efecto de la infección con *T. maritimum* sobre parámetros hematológicos e inmunológicos y el efecto de factores inherentes a las vacunas y de la temperatura ambiente, en el desarrollo de la respuesta inmune protectora en rodaballo y lenguado. Los resultados de este estudio han proporcionado información de interés para la selección de marcadores del estado sanitario de los peces y para el establecimiento de estrategias de vacunación eficaces adaptadas a los sistemas de cultivo de rodaballo y lenguado, especies de alto valor comercial a nivel mundial.

Palabras clave; *Tenacibaculum*, *Aeromonas*, *Vibrio*, Rodaballo, Lenguado.

ABSTRACT

Aquaculture is one of the fastest growing sectors in recent years. Intensification of aquaculture production has been accompanied by the emergence of pathological problems, causing significant economic losses to the industry. The development of effective methods of prevention and control of infectious diseases requires the identification of etiological agents and knowledge of their effect on the immune system of fish. In this study, the main bacteria causing mortality in turbot and sole grown in farms in Northwest Spain (Galicia) have been identified and techniques based on spectrophotometry and flow cytometry for the analysis of the innate immune response have been standardised. In addition, the effect of experimental infection with *T. maritimum* on haematological and immunological parameters and the effect of factors inherent to vaccines and ambient temperature on the development of the protective immune response in turbot and sole have been analysed. The results of this study have provided information of interest for the selection of markers of fish health status and for the establishment of effective vaccination strategies adapted to the farming systems of turbot and sole, species of high commercial value worldwide

Keywords; *Tenacibaculum*, *Aeromonas*, *Vibrio*, Turbot, Sole.

RESUMO

A acuicultura é um dos sectores que experimentou maior crescimento nos últimos anos. A intensificação na produção acuícola viu-se acompanhada da aparição de problemas patológicos, causando perdas económicas significativas para a indústria. O desenvolvimento de métodos eficazes de prevenção e control de enfermidades infecciosas require a identificação dos axentes etiológicos e o coñecemento do seu efecto sobre o sistema inmunitario dos peixes. No presente estudo identificáronse as principais bacterias causantes de mortalidad en rodaballos e lenguados cultivados en piscifactorías do Noroeste de España (Galicia) e estandarizaronse técnicas baseadas en espectrofotometría e citometría de fluxo para a análise da resposta inmune innata. Ademais, analizáronse o efecto da infección experimental con *T. maritimum* sobre parámetros hematolóxicos e inmunolóxicos e o efecto de factores inherentes ás vacunas e da temperatura ambiente, no desenvolvemento da resposta inmune protectora en rodaballo e lenguado. Os resultados deste estudo proporcionaron información de interese para a selección de marcadores do estado sanitario dos peixes e para o establecemento de estratexias de vacunación eficaces adaptadas aos sistemas de cultivo de rodaballo e lenguado, especies de alto valor comercial a nivel mundial.

Palabras clave; *Tenacibaculum*, *Aeromonas*, *Vibrio*, Rodaballo, Lenguado.



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1.- Importancia de la acuicultura marina.....	1
1.2.- Principales enfermedades bacterianas que afectan al cultivo de peces planos.....	5
1.2.1.- La tenacibaculosis o flexibacteriosis marina.....	5
1.2.2.- La furunculosis.....	7
1.2.3.- La vibriosis.....	8
1.2.4.- Diagnóstico de la tenacibaculosis, furunculosis y vibriosis.....	10
1.2.5.- Prevención de la tenacibaculosis, furunculosis y vibriosis.....	12
1.3.- El sistema inmunitario de peces teleósteos.....	17
1.3.1.-Mecanismos de defensa específicos.....	17
1.3.2.-Mecanismos de defensa inespecíficos.....	19
1.4.-Aplicación de la citometría de flujo al estudio de la respuesta inmune.....	22
2. OBJETIVOS.....	27
3. ESTUDIO DE LAS PRINCIPALES PATOLOGÍAS QUE AFECTAN AL RODABALLO Y LENGUADO.....	29
3.1.-Materiales y Métodos.....	29
3.1.1.-Cepas bacterianas: Origen, aislamiento y conservación.....	29
3.1.2.- Caracterización taxonómica.....	29
3.1.3.- Peces utilizados, centro de experimentación y condiciones de mantenimiento ...	33
3.1.4.- Ensayos de virulencia en peces.....	34
3.2.-Resultados.....	35
3.2.1.- Identificación mediante métodos convencionales y sistemas multiprueba.....	35
3.2.2.- Caracterización serológica.....	41
3.2.3.- Caracterización molecular.....	42
3.3.- Discusión.....	46
4. OPTIMIZACIÓN DE TÉCNICAS DE ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE NO ESPECÍFICA.....	49
4.1.- Materiales y métodos.....	49
4.1.1.- Peces utilizados y condiciones de mantenimiento.....	49
4.1.2.-Evaluación de métodos para estudiar la respuesta inmune humoral.....	49
4.1.3.- Optimización de técnicas de estudio de la respuesta inmune celular.....	51
4.1.4.- Análisis estadístico.....	58
4.2.- Resultados.....	58
4.2.1.- Estudio de la respuesta inmune inespecífica en rodaballo.....	58
4.2.2. Optimización de métodos de estudio de la respuesta celular no específica.....	60
4.3.- Discusión.....	82

5.-EFECTO DE LA INFECCIÓN SOBRE LA RESPUESTA INMUNE NO ESPECÍFICA	87
5.1.- <i>Materiales y Métodos</i>	87
5.1.1.- Infecciones experimentales	87
5.1.2.-Efecto de la infección sobre el hematocrito y poblaciones de leucocitos	88
5.1.3.- Efecto de la infección sobre la respuesta inmune no específica	88
5.2.- <i>Resultados</i>	89
5.2.1.- Infección experimental	89
5.2.2.- Efecto de la infección sobre parámetros hematológicos	90
5.2.3.- Efecto de la infección sobre la respuesta inmunitaria no específica	91
5.3.- <i>Discusión</i>	96
6. EFICACIA DE LA IMMUNIZACIÓN: FACTORES INHERENTES A LA VACUNA	99
6.1.- <i>Materiales y Métodos</i>	99
6.1.1.- Vacunas y vías de administración	99
6.1.2.- Evaluación de la eficacia de las vacunas: ensayos in vivo e in vitro	101
6.1.3.- Efecto del lote y tiempo postproducción de la vacuna	102
6.1.4.-Efecto de la composición antigénica de la vacuna	103
6.1.5.- Análisis estadístico	108
6.2.- <i>Resultados</i>	109
6.2.1.- Efecto de parámetros de producción de la vacuna en la eficacia	109
6.2.2.- Efecto de la composición de las vacunas en la eficacia de la inmunización	112
6.3.- <i>Discusión</i>	119
7. EFECTO DE LA ESTRATEGIA DE IMMUNIZACIÓN EN LA EFICACIA DE LA VACUNACIÓN	123
7.1.- <i>Material y métodos</i>	123
7.1.1.- Factores relacionados con la estrategia de vacunación	123
7.1.2.- Estudio del efecto de la temperatura del agua de cultivo	126
7.1.3.-Análisis estadístico	128
7.2.- <i>Resultados</i>	128
7.2.1.- Influencia de factores inherentes a la estrategia de vacunación en la eficacia de la inmunización	128
7.2.2.- Efecto de la temperatura en la respuesta inmunitaria	137
7.3.- <i>Discusión</i>	138
8.- DISCUSIÓN GENERAL	143
9.- CONCLUSIONES	147
10.-BIBLIOGRAFÍA	149





1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1.- Importancia de la acuicultura marina

La demanda mundial de pescado se multiplicó en las últimas décadas y la perspectiva es que siga esa línea, debido al incremento de la población y al aumento del consumo de pescado por ser considerado un alimento sano y esencial para la dieta.

El aporte de pescado derivado de la pesca extractiva alcanzó sus máximos a finales de los años 80 y desde entonces fluctúa en torno a los mismos niveles sin sobrepasar el techo de las 95 millones de toneladas (Apromar, 2016), lo que indica que los océanos se están explotando cerca de su producción máxima debido a la sobrepesca, la contaminación y a la falta de una política que fomente un crecimiento sostenible. Las capturas mundiales de la pesca extractiva se han estabilizado en los últimos 20 años en torno a los 90 millones de toneladas anuales. La estabilización de la pesca en los últimos años, junto con el aumento creciente de la demanda de productos acuáticos, ha impulsado el desarrollo de la acuicultura, produciendo 110,2 millones de toneladas en 2014 (Apromar, 2016, 2018). Tras un constante crecimiento, la acuicultura se encuentra en disposición de proporcionar más de la mitad del pescado consumido por la población humana mundial (Figura 1). Según datos de la FAO (2014), se estima que para el 2030, el 65% de los productos acuáticos procederán de la acuicultura. Sin embargo, se ha producido una reducción en el ritmo de crecimiento de la acuicultura global, que ha pasado de una media interanual del 9% en la década de los 80 y 90, al 6% en la primera década del siglo XXI. Si bien es cierto que, a pesar de la crisis acaecida en los últimos años en todos los sectores industriales, la acuicultura ha sabido mantener su cuota de mercado.

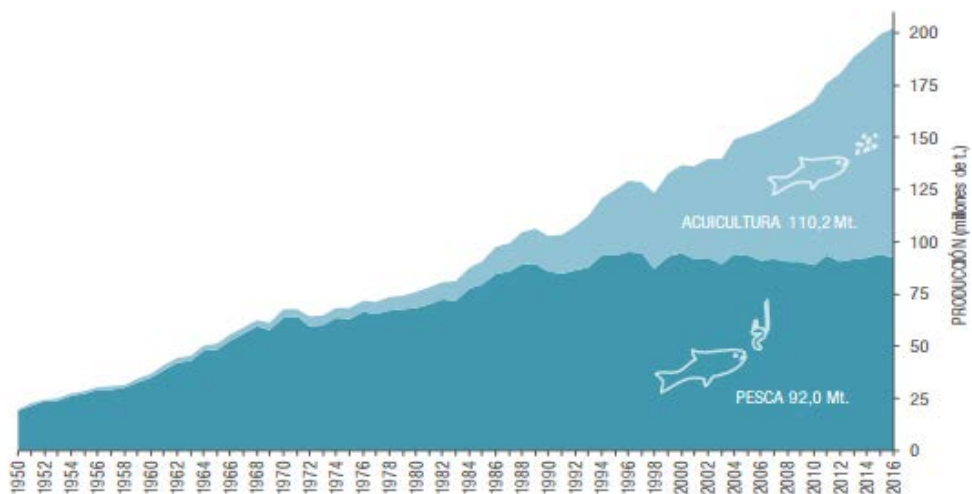


Figura 1.-Evolución de la producción pesquera (pesca y acuicultura) en el mundo en el periodo 1950-2016 (FAO,2018).

Por ello, la acuicultura supone una alternativa de futuro. Según los analistas, no tanto como un complemento de la pesca sino como un proceso natural de evolución, que tenderá al reemplazo de ésta, de hecho según datos de APROMAR (2018) la acuicultura superó en el año 2016 a la pesca en 18,2 millones de toneladas.

Además, la principal ventaja de la acuicultura respecto a la pesca es la disponibilidad de productos durante todo el año y a precios estables, ofreciendo una seguridad alimentaria e higiénico-sanitaria mediante el control y análisis de los animales y de su alimentación, que reflejan una completa trazabilidad.

La acuicultura europea sitúa su producción en 1,3. millones de toneladas, (APROMAR 2018). Según los datos extraídos del informe de la FAO del 2014, España destaca sobre todo por la selección de especies de alto valor comercial, como el mejillón europeo (*Mytilus galloprovincialis*), la trucha arcoíris (*Orcorhynchus mykiss*), la lubina (*Dicentrarchus labrax*), la dorada (*Sparus aurata*), el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) y el lenguado (*Solea senegalensis*). El principal recurso acuático vivo de España es el mejillón, del que en 2016 se cosecharon 215.855 toneladas, siendo el segundo el atún listado, del que se capturaron 148.396 toneladas (APROMAR, 2018).

Según datos de la FAO (2014), España es el principal productor de la Unión Europea en cuanto a toneladas producidas (22% del total de la UE), pero no así en cuanto a valor económico donde se sitúa en cuarto lugar, muy posiblemente debido a la gran producción de mejillón que baja la media económica. Como ya comentamos, en los últimos diez años, se ha ralentizado el crecimiento de la acuicultura con tan solo un 3,6% de incremento anual. En el año 2014 el principal producto en cuanto a toneladas producidas fue el mejillón (220.449 t), seguido por la lubina (17.376 t), esta diferencia se ve acortada de forma significativa si nos fijamos en el valor económico. (Figura 2).

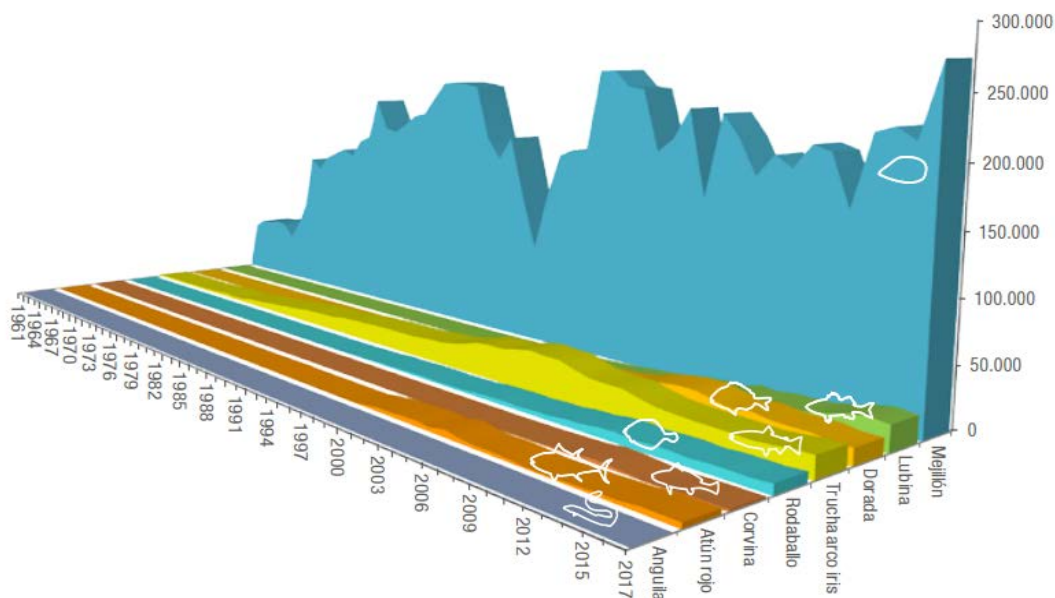


Figura 2.- Producción de acuicultura (t) en España desde 1961 hasta el año 2017 (APROMAR, 2016).

Si nos fijamos en la evolución del número de establecimientos vemos que se produjo una pérdida del 4 % desde el año 2007 (APROMAR, 2018). Por suerte, esta reducción no afectó a Galicia que en este momento conserva todas sus granjas y mantiene sus producciones a pesar de lo ocurrido en el resto de España. En cuanto a valor económico, Galicia supera el

21% respecto a España y alcanza el 1% respecto a Europa. Esto es debido fundamentalmente a que Galicia presenta unas condiciones naturales inmejorables, especialmente en las rías, y a la apuesta que se hizo por la acuicultura desde las empresas y la administración gallega (Apromar, 2016). Además, Galicia ya hace años se especializó en peces de alto valor económico y en monopolios de mercado.

El cultivo del rodaballo

La producción europea de rodaballo en el 2015 ha sido de 11.555 toneladas, un 27% de incremento respecto a 5 años atrás, y un 4,4 % en el último año. El rodaballo de crianza en España supone un 76,4% del total comercializado, la bajada de los últimos años se ha debido al repunte del cultivo de esta especie en Portugal (20,08 %), convirtiéndose en el segundo productor. Aún así, la producción de rodaballo en España creció 15,5 % en el año 2017, respecto al año anterior. Aún existe una pequeña cantidad que proviene de la pesca extractiva sobre todo de los Países Bajos, aunque su tendencia en los últimos años es a bajar (Figura 3).

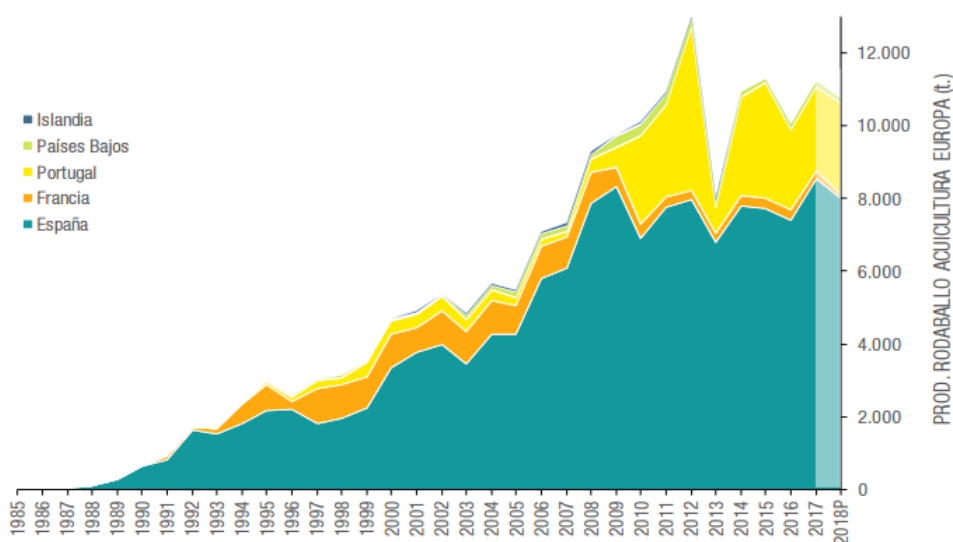


Figura 3.- Evolución de la producción acuícola del rodaballo en Europa (1985-2018P) (APROMAR, 2018).

Galicia es la principal comunidad autónoma productora con un 99 % del total, gracias a que es la región donde el engorde de rodaballo se completa en menos tiempo, por la riqueza y temperatura de sus aguas, así como por los avances técnicos en la cría de esta especie (Tabla 1) (APROMAR, 2018).

El rodaballo es una de las especies con mayor potencial para la acuicultura y para el cual existe una gran demanda en mercados del norte de Europa. (Pillay, 1997).

El cultivo del lenguado

El lenguado es la especie que más recientemente se ha incorporado a la producción a gran escala en España. El logro del cultivo de esta especie supone la culminación de muchos años de investigación científica y desarrollo tecnológico (APROMAR, 2018). Hoy en día España se encuentra a la cabeza de Europa en la producción de esta especie (Figura 4). En estos momentos entre los factores que limitan el lanzamiento de la producción se encuentra el escollo de los tramites administrativos para conseguir ubicaciones para las granjas, además de la necesidad de seguir investigando para seguir mejorando el proceso productivo

(APROMAR, 2016).

En cuanto a la producción de este pez plano desde el año 2009, Galicia estuvo a la cabeza de la producción de lenguado como ocurrió con el rodaballo, aunque en los últimos años Andalucía le restó terreno en la producción quizás motivado por el gran esfuerzo económico, científico y administrativo, la temperatura de sus aguas y también por el gran esfuerzo científico realizado en esta zona (Tabla 2).

Tabla 1.- Distribución Evolución de la producción de rodaballo (Tm) en España (APROMAR, 2016; 2018)

Rodaballo	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2018
Asturias	65	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cantabria	215	280	250	200	50	100	75	75	108	85
Galicia	5.725	7.510	8.070	6.710	7690	7845	6729	7733	7607	8460
País Vasco	75	80	0	0	15	25	10	0	0	0
Total	6.080	7.820	8.320	6.910	7755	7970	6814	7808	7715	8546

Tabla 2.- Evolución de la producción de lenguado (Tm) en España (APROMAR, 2016; 2018)

Lenguado	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2017
Andalucía	24	10	10	4	0	0	13	240	247	506
Canarias	6	15	28	30	31	24	30	28	29	0
Galicia	30	30	150	170	79	170	300	518	388	324
Murcia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	60	55	188	204	110	194	343	786	664	830

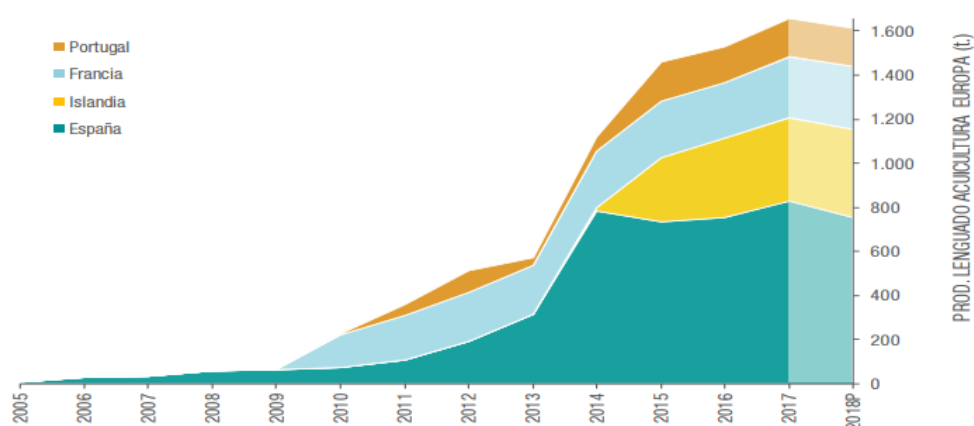


Figura 4.-Evolución de la producción acuícola de lenguado senegalés en Europa (2005-2018P) (APROMAR, 2018).

1.2.- Principales enfermedades bacterianas que afectan al cultivo de peces planos

Galicia posee potencial tanto natural como humano para hacer de la acuicultura una actividad rentable. Desafortunadamente la intensificación en la producción se ha visto acompañada de la aparición de problemas patológicos (Santos, 2005; Toranzo y col., 2005). Por lo que la prevención y el control de las patologías son actualmente una de las prioridades para el mantenimiento y el progreso del sector.

Entre las enfermedades de etiología bacteriana más destacadas para piscicultura marina se encuentran la vibriosis producida por *Vibrio anguillarum* y otras especies del género *Vibrio*, la furunculosis producida por *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* y la flexibacteriosis causada por *Tenacibaculum maritimum* (anteriormente *Flexibacter maritimus*) y microorganismos relacionados taxonómicamente (Santos, 2005; Toranzo y col., 2005; Piñeiro-Vidal, 2008 a y b).

1.2.1.- La tenacibaculosis o flexibacteriosis marina

La tenacibaculosis o flexibacteriosis marina fue descrita por primera vez en Japón (Hikida y col., 1979) en alevines de pargo japonés (*Pagrus major*) y besugo japonés (*Acanthopagrus schlegeli*). La enfermedad se diagnosticó por vez primera en Europa a finales de los años 70, en cultivos de lenguados en Escocia bajo el término de enfermedad de los puntos negros o "*Black Patch Necrosis*" (BPN, McVicar y White, 1979). Sin embargo, la identificación de la bacteria filamentosa implicada, de características parecidas a *Flavobacterium columnare* (Campbell y Buswell, 1982), no se realizó hasta el año 1990 (Bernadet y col., 1990). Desde entonces la enfermedad ha sido descrita bajo diferentes denominaciones que hacen referencia a los síntomas clínicos de la enfermedad (enfermedad de bacterias deslizantes, flexibacteriosis marina, podredumbre de aletas y cola y síndrome de la boca erosionada, enfermedad similar a la causada por *F. columnare*) (McVicar y White 1979; 1982; Wakabayashi y col. 1984; Bernardet y col. 1990; Alsina y Blanch 1993; Handler y col. 1997; Ostland y col. 1999, Cepeda y Santos, 2002), siendo siempre aislado como el agente causal de la enfermedad la bacteria *T. maritimum*.

La tenacibaculosis marina ha sido, desde principios de los 90, un problema continuo en la piscicultura marina de Galicia. Desde 1992 hasta la actualidad *T. maritimum* ha sido el principal agente causal de mortalidades en rodaballo, siendo aislado esporádicamente a partir de salmón (*Salmo salar*) y dorada y otras especies de cultivo y salvajes (Hansen y col., 1992; Pazos y col., 1993; Pazos, 1997; Bernardet, 1997; Santos y col., 1999; Bergh y col., 2001; Samuelsen y col., 2006). A partir del año 2000, *T. maritimum* ha sido aislado de forma continuada a partir de lenguado cultivado en nuestra comunidad (Cepeda y Santos, 2002; Santos, 2005).

Desde el año 2007 se han aislado a partir de rodaballos, lenguados y lubinas enfermas y del agua de mar de los tanques de cultivo otras bacterias filamentosas con caracteres fenotípicos similares a *T. maritimum*, originalmente denominadas como *T. maritimum* atípicos o bacterias relacionadas con *T. maritimum* (Piñeiro-Vidal y col., 2007), que posteriormente fueron caracterizadas y asignadas a las nuevas especies *T. discolor*, *T. gallaicum*, *T. soleae* y *T. dicentrarchi* (Piñeiro-Vidal y col., 2008 a y b; 2012). Algunas de estas especies han sido posteriormente aisladas de *Scophthalmus rhombus* y *Dicologlossa cuneata* (*T. soleae*) en el Sur de España (López y col., 2010) y de salmón Atlántico (*Salmo salar*) en Chile (*T. dicentrarchi*) (Avendaño-Herrera y col., 2016).

Con respecto a la patología de la tenacibaculosis, las lesiones ulcerativas sobre la

superficie externa son el signo clínico más característico de la enfermedad. El tamaño y la localización de las lesiones difieren en función de la especie (Chen y col., 1995; Handler y col., 1997) y la edad del pez (Baxa, 1988). Las lesiones aparecen con mayor frecuencia sobre la superficie de la piel, de las aletas, cola, opérculo o cabeza (Figura 5).

En estadios tempranos de la infección aparece un oscurecimiento del tejido interrredial, sobre todo entre las aletas caudal y marginal, donde se muestra una consistente fragmentación y degeneración del epitelio. En este proceso se observa infiltración de material de tipo proteico, acompañado con congestión y hemorragia de la dermis superficial. Estas lesiones se extienden a la dermis y capas musculares más profundas, causando fuertes hemorragias (Failde y col., 2008).

La enfermedad puede tener carácter sistémico, a pesar de que internamente no se observan daños, se ha aislado el patógeno de riñón, bazo o hígado (Baxa y col., 1988; Alsina y Blanch, 1993; Pazos, 1997; Ostland y col., 1999; Santos y col., 1999; Cepeda y Santos, 2002; Avendaño-Herrera y col., 2006).

Otro síntoma observado en los peces afectados es que muestran natación errática, anorexia e irregularidades respiratorias (Devesa y col., 1989).

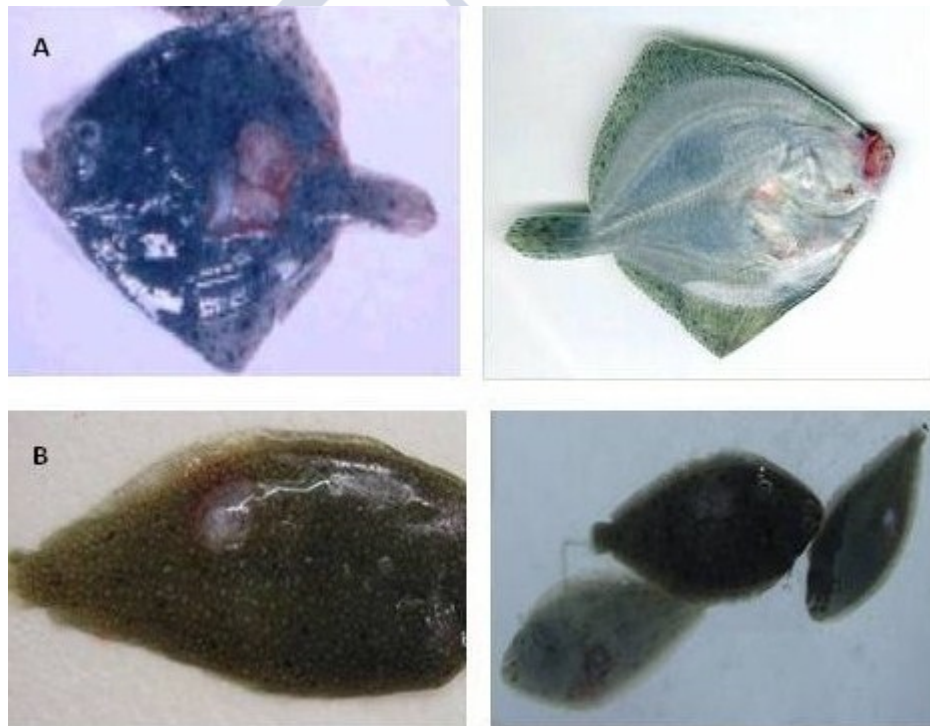


Figura 5.- Signos externos de tenacibaculosis marina en rodaballo (A) y lenguado senegalés (B).

El modo de transmisión y la vía de infección de *T. maritimum* y otras especies del género *Tenacibaculum* patógenas son todavía inciertos. Los ensayos de patogenicidad han demostrado que cuando los peces se exponen a la aplicación tópica de *T. maritimum* (Wakabayashi y col., 1984) o a una combinación de aplicación tópica e inmersión en cultivos bacterianos (Baxa y col., 1987) se producen mortalidades sensiblemente superiores a las observadas cuando las infecciones experimentales se realizaban mediante inyección intramuscular o mediante baño. Estudios de infección, por inmersión de los peces en una

suspensión de la bacteria durante períodos prolongados (60-90 minutos a 18 horas), sugieren que el agua también podría ser una ruta de infección de *T. maritimum* en salmón del Atlántico, trucha arcoiris, “greenback flounder” (*Rhombosolea tapirina*) y rodaballo (Soltani y col., 1996; Handler y col., 1997; Avendaño-Herrera y col., 2006).

Los reservorios naturales del patógeno son desconocidos. *T. maritimum* fue aislado a partir de sedimentos, de agua y de la superficie de tanques que habían estado en contacto con peces infectados (Carson y col., 1993; Santos y col., 1999). Por otro lado, se ha establecido que *T. maritimum* posee una gran capacidad de adherencia al mucus de dorada y rodaballo, así como resistencia a la acción bactericida del mucus (Magariños y col., 1995; Pazos, 1997), lo que podría indicar que peces sanos y/o asintomáticos pudieran actuar como reservorio. Mabrok y col., (2016) llegaron a una conclusión similar evaluando la actividad bactericida del mucus de lenguado. Por otra parte, Failde y col (2014) observaron la presencia de *T. maritimum* en el lumen intacto del tracto gastrointestinal de lenguados y rodaballos enfermos, lo que les animó a sugerir el posible papel del intestino como reservorio del patógeno (Failde y col., 2013; Failde y col, 2014).

1.2.2- La furunculosis

Aeromonas salmonicida fue aislado por primera vez a partir del furúnculo de una trucha cultivada en el norte de Alemania y se le denominó como “Bacilo de la enfermedad contagiosa de la trucha” (Austin y Austin 2016). Hasta 1953, fecha en la que Griffin y col (1953) proponen su inclusión en el género *Aeromonas*, la bacteria fue descrita bajo el término de *Bacillus salmonicida*. Desde su primera descripción, la especie *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ha sido descrita por varios investigadores como el agente causante de furunculosis en distintas especies de peces salmónidos y no salmónidos (Mac Carthy, 1977; Hastein y col, 1978; Elliot y Schotts, 1980; Cornick y col, 1984; Kito y col, 1984; Dalsgaard y Panlsen, 1986; Wiklund, 1990; Toranzo y Barja, 1991; Wiklund, 1991; Real y col, 1994; El Morabit y col, 2004; Faisal y col. 2007).

Los principales signos externos de la furunculosis en peces afectados son la aparición de áreas hemorrágicas en la base de las aletas pectorales y la boca, lesiones ulcerativas en la superficie dorsal y ventral. En el caso concreto del rodaballo, se observan úlceras crateriformes sobre los tubérculos óseos (Figura 6).

Internamente se observan hemorragias en vísceras, corazón y pared abdominal (Toranzo y Barja, 1992; Real y col. 1994; Austin y Austin, 2016).

En diversos estudios se ha investigado el papel del agua, sedimentos y detritos, como potenciales fuentes de infección por *A. salmonicida*. Sin embargo, los factores que determinan la difusión del agente patógeno, así como la vía de transmisión aún no han sido esclarecidos (Rose, y col, 1990; Toranzo y col, 1991; Austin y Austin, 2016). Es un hecho aceptado que los peces pueden actuar como reservorio de infección pudiendo contribuir a difundir la enfermedad por vía horizontal y/o vertical, aunque a día de hoy la vía de infección no ha sido aún clarificada (Austin y Austin, 2016). En otro estudio, El Morabit y col (2004) describieron el aislamiento, caracterización y grado de virulencia de cepas de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* aisladas a partir de lamprea (*Petromyzon marinus*). Todas las cepas bacterianas probadas fueron virulentas para trucha arcoíris con dosis letales 50% (LD₅₀) similares a las descritas en cepas aisladas de peces salmónidos (10³ a 10⁷ UFC/ml). En base a estos resultados, El Morabit y col. (2004) concluyen que la lamprea marina puede actuar como portadora de cepas virulentas de *A. salmonicida* y, por tanto, puede representar un riesgo de transmisión de *A. salmonicida* a peces salvajes y cultivados.



Figura 6.- Signos de furunculosis observados rodaballos cultivados

1.2.3.- La vibriosis

La vibriosis marina fue descrita por primera vez en 1761 por Bonaveri (Hofer, 1904), pero su agente causal no fue aislado hasta finales del siglo XIX (Canestrini, 1893). En 1909, Bergman realiza una descripción del patógeno y propone el nombre de *Vibrio anguillarum* para designarlo. Posteriormente, MacDonell y Colwell (1985) realizaron estudios filogenéticos basados en el análisis del RNA ribosómico 5S (RNAr 5S) proponiendo la inclusión de *Vibrio anguillarum* en el nuevo género denominado *Listonella* con el nombre específico de *Listonella anguillarum*. Este género incluiría además la especie *V. pelagius* con el nombre específico de *Listonella pelagica*. Sin embargo, el estudio de la composición de ácidos grasos de las especies del género *Vibrio* (Urdaci y col., 1990), no apoyan esta designación. Actualmente la familia *Vibrionaceae* comprende ocho géneros validados (Urbanczyk y col., 2007): *Aliivibrio*, *Catenococcus*, *Enterovibrio*, *Grimontia*, *Listonella*, *Photobacterium*, *Salinivibrio* y *Vibrio*. Actualmente la clasificación aceptada para *V. anguillarum* y *V. pelagius* es dentro del género *Vibrio* (Thompson y col, 2011; Hickey y Lee, 2017), por tanto, a los efectos de la presente Tesis doctoral se empleará el nombre específico de *Vibrio anguillarum* y de *Vibrio pelagius*.

En la actualidad, se aplica el término vibriosis a un amplio rango de enfermedades de peces, moluscos y crustáceos causadas por diferentes especies del género *Vibrio*, *Listonella* y *Aliivibrio* (Santos, 2005; Toranzo y col., 2005).

En Galicia la vibriosis ha sido un problema recurrente en las piscifactorías, causando grandes pérdidas económicas, siendo *Vibrio anguillarum* el principal causante de epizootias en todas las especies de peces marinos cultivadas en nuestra área. Aunque se han descrito un total de 23 serotipos en esta especie, la mayoría de los aislados implicados en mortalidades en Europa, USA, Japón pertenecían a los serotipos O1 y O2 (subgrupos O2 α y O2 β), mientras que el serotipo O3 (subgrupos O3A) ha sido descrito como agente causal de infección en lubina, dorada, anguilla y ayu (*Plecoglossus altivelis*) cultivados en Europa y Japón (Larsen y col., 1994; Santos y col., 1995, Toranzo y col., 1997; Santos 2005, Toranzo y col. 2005).

La vibriosis presenta la sintomatología típica de una septicemia hemorrágica, aunque pueden existir variaciones en función de la edad del pez afectado (Figura 7). Los primeros y en ocasiones únicos signos de vibriosis en peces juveniles son a menudo, pérdida del apetito, oscurecimiento de la piel y muerte súbita, pudiendo sumarse a veces una hidropesía

abdominal y/o periorbital. La enfermedad se caracteriza por la presencia de lesiones hemorrágicas en aletas, cola y boca, así como por petequias en órganos internos y cavidad peritoneal, dilatación y licuefacción de bazo y riñón. Los niveles de mortalidad provocados por este microorganismo superan en muchos casos el 50% en poblaciones cultivadas, particularmente en peces juveniles.



Figura 7.- Signos clínicos característicos en peces afectados por vibriosis.

En casos crónicos la gravedad de la anemia hemolítica, resultante de los efectos de productos extracelulares líticos, causa una gran deposición de hemosiderina en los melanomacrófagos de los elipsoides (Devesa y col., 1985; Bruno y Poppe, 1996).

Uno de los principales reservorios de la vibriosis lo constituyen los alevines procedentes de aguas marinas y salobres (Muroga y col 1984; 1986). Aunque estas bacterias tienen un crecimiento óptimo entre 1 y 2% de sal, tienen gran capacidad para adaptarse a un amplio rango de concentraciones salinas (Evelyn, 1971; Nishibuchi y Muroga 1977). Estudiando la influencia de otros parámetros ambientales se observó que el crecimiento de la bacteria estaba fuertemente relacionado con la temperatura y el pH, mientras que la salinidad jugaba un papel de menor importancia (Larsen 1982, 1984).

Por otra parte, Sorensen y Larsen (1986) examinando más de 500 cepas de *V. anguillarum* aisladas de peces salvajes y cultivados, agua de mar, sedimentos e invertebrados, encontraron que los vibrios patógenos procedían principalmente de peces enfermos. Tajima y col. (1988), estudiaron la distribución de *V. anguillarum* en sistemas de cultivo de salmón coho, encontrando resultados similares.

Trabajos realizados por Toranzo y col. (1982) y Muroga y col. (1986) sobre la supervivencia de *V. anguillarum* en el medio acuático, han puesto de manifiesto que ésta bacteria persiste en agua de mar y salobre durante más de 15 y 100 días, respectivamente. Sin embargo, su supervivencia en agua dulce es mucho menor, reduciéndose el número de bacterias viables en un plazo de 3 a 5 horas y desapareciendo totalmente entre 8 y 10 días.

Por otra parte, Kaneko y Colwell (1978) han demostrado que la adherencia a superficies inertes así como a fitoplancton y/o zooplancton, puede ser un importante determinante ecológico para la multiplicación y supervivencia de vibrios marinos.

Investigadores daneses (Larsen y col., 1978; Larsen, 1982; Larsen y Willeberg, 1984), estudiando la distribución anual de *V. anguillarum* en agua y sedimentos de zonas con diferente grado de contaminación, han encontrado que el número de bacterias era significativamente superior en el sedimento que en la columna de agua, siendo siempre más elevado en zonas con elevado grado de polución.

1.2.4.- Diagnóstico de la tenacibaculosis, furunculosis y vibriosis

El diagnóstico presuntivo de la tenacibaculosis, furunculosis y vibriosis se basa en la observación de los signos clínicos en combinación con el examen microscópico de preparaciones en fresco o teñidas obtenidas a partir de las lesiones. Sin embargo, sólo el aislamiento en cultivo puro de las bacterias y su posterior caracterización mediante la aplicación de las técnicas clásicas de identificación, métodos moleculares y serológicos, permiten el diagnóstico confirmativo de estas enfermedades.

Para el aislamiento de *A. salmonicida*, *V. anguillarum* y *T. maritimum* a partir de peces o para su cultivo en laboratorio se han descrito diferentes medios generales, específicos, selectivos y/o diferenciales (Buller, 2014; Austin & Austin, 2016) (Tabla 3).

Los medios de cultivo generales recomendados para el aislamiento de *A. salmonicida* y *V. anguillarum* son Agar triptona soja (TSA), Agar nutritivo (AN), Agar infusión cerebro corazón (BHIA), suplementados con cloruro sódico o alternativamente Agar Marino (AM). Para el aislamiento diferencial de cepas virulentas de *A. salmonicida* se ha descrito (Udey, 1982) el medio Agar Nutritivo Azul Comasie (CBB). En el caso de *V. anguillarum* el medio selectivo más utilizado es el Tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS).

Los medios de cultivo específicos para el aislamiento de *T. maritimum* son el Agar Cytophaga (AOA, Anacker y Ordal, 1955, 1959), y sus modificaciones (Hikida y col., 1979; Wakabayashi y col., 1984; Bullock y col., 1986) Agar *Flexibacter maritimus* o FMM, (Pazos y col., 1996) y Agar *Tenacibaculum maritimum* o TMM, (Cepeda y col., 2003). Para el aislamiento de esta bacteria también se puede utilizar el medio general Marine Agar (AM) (Campbell y Buswell, 1982; Pazos y col., 1996).

La identificación de los aislados de *Vibrio*, *Aeromonas* y *Tenacibaculum* se basa en el análisis de las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas del patógeno utilizando métodos convencionales en tubo y placa o sistemas multiprueba. Entre las galerías comerciales de mayor utilidad para la identificación de estos microorganismos destacan el sistema API 20E (BioMérieux, Francia) de utilidad en la identificación de *V. anguillarum* y *A. salmonicida* o los sistemas API ZYM y API 50CH que facilitan la caracterización de cepas de *T. maritimum* y organismos relacionados, ofreciendo resultados en tan sólo 24 horas.

Las técnicas serológicas basadas en la reacción antígeno-anticuerpo, también han sido descritas como útiles para el diagnóstico de las enfermedades causadas por miembros de los géneros *Vibrio*, *Aeromonas* y *Tenacibaculum* (González y col., 2003; Santos y col., 1995; Toranzo y col., 2005).

Las técnicas basadas en la aglutinación tienen un uso limitado para el caso de *T. maritimum* y *A. salmonicida* debido a la existencia de cepas autoaglutinantes. Otras técnicas serológicas alternativas descritas para estos patógenos incluyen los ensayos Dot Blot e immunoblot, la inmunodifusión, el ensayo inmunoenzimático (ELISA) y la inmunofluorescencia directa. Aunque estos métodos presentan alta sensibilidad, son costosos y lentos y en la mayoría de los casos requieren el aislamiento del microorganismo en cultivo puro. (Toranzo y col. 1987; Santos y col. 1995; González y col. 2003).

En el caso de *V. anguillarum* pueden utilizarse la aglutinación en portaobjetos o los ensayos Dot blot indistintamente (Cipriano y col., 1985; Toranzo y col., 1987; Santos y col., 1995; Buller, 2014; Austin y Austin, 2016) pero solo el ensayo Dot blot permite la diferenciación de los subgrupos antigénicos O2 α , O2 β y O3a sin necesidad de utilizar sueros absorbidos (Santos y col., 1995). Además, se ha descrito la utilidad de técnicas serológicas rápidas como el ensayo inmunoenzimático (ELISA) (Romestand y col., 1993) y de los

sistemas comerciales como Aquaedia® y Aquarapid® (Bionor AS), basados igualmente en técnicas inmunoenzimáticas (González y col. 2003).

El empleo de métodos moleculares como la hibridación con sondas específicas y la aplicación de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) han facilitado el diagnóstico de las tres enfermedades (Buller, 2014; Austin y Austin, 2016).

Para la identificación de *T. maritimum* Toyama y col. (1996) y Bader y Shotts (1998) desarrollaron dos pares de cebadores y dos programas de amplificación, basándose en las secuencias disponibles de la región del DNA que codifica el RNA 16S en *T. maritimum* (Woese y col., 1990). En el año 2003, Cepeda y colaboradores describen un método molecular, rápido (menos de 4 h) y no tóxico, basado en la técnica de la PCR anidada para el diagnóstico de la tenacibaculosis causada por *T. maritimum*. Este método fue validado de acuerdo con los protocolos de validación ya descritos para patógenos de peces (Hiney, 1997; Hiney y Smith, 1998). Posteriormente, Avendaño-Herrera y col (2004) describieron un método no destructivo para la detección de *T. maritimum* en el mucus de peces. Sin embargo, dado que *T. maritimum* es un microorganismo característico de ambientes marinos y tiene capacidad de resistir la acción bactericida del mucus de dorada y rodaballo, la presencia del microorganismo en el mucus no necesariamente indicaría que los peces padecen la enfermedad.

Tabla 3.- Medios para el aislamiento bacteriano

Bacteria	Medios de cultivo específicos
<i>Tenacibaculum maritimum</i>	Agar Cytophaga
	Agar <i>Flexibacter maritimus</i>
	Agar <i>Tenacibaculum maritimum</i>
Bacteria	Medios de cultivo generales
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Agar triptona soja + 1% de NaCl
	Agar nutritivo+1% NaCl
<i>Vibrio anguillarum</i>	Agar Infusión Cerebro corazón+1% NaCl
<i>Aeromonas salmonicida</i>	
<i>Vibrio anguillarum</i>	Agar Marino
<i>Tenacibaculum maritimum</i>	
Bacteria	Medios selectivos/ diferenciales
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Agar Nutritivo Azul Comasie
<i>Vibrio anguillarum</i>	Tiosulfato citrato bilis sacarosa
	Medio para <i>Vibrio anguillarum</i>
<i>Tenacibaculum maritimum</i>	Medio Selectivo para <i>Flexibacter</i>

También se han diseñado ensayos de alta sensibilidad que combinan PCR y ELISA (Wilson y col., 2002), transcripción reversa-PCR (RT-PCR) con hibridación en medio líquido (Wilson y Carson, 2003) y PCR e hibridación en medio sólido empleando como soporte una matriz que contiene las sondas específicas (PCR-DNA Microarrays) para detectar *V. anguillarum* y *A. salmonicida* (González y col., 2004; Warsen y col., 2004).

Para la identificación de *A. salmonicida* dada la naturaleza homogénea de esta subespecie se han utilizado ensayos de hibridación DNA-DNA, ribotipado, análisis del polimorfismo genómico (RAPD), análisis plasmídico y electroforesis en campo pulsado (Belland y Trustg, 1988, Toranzo y col., 1991, Miyata y col., 1995; Livesley y col., 1999; O'hici y col., 2000).

Para el diagnóstico de la furunculosis causada por *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* se han desarrollado también protocolos basados en la técnica de PCR que utilizan cebadores que flanquean una región de un plásmido críptico de 6,4 kb (Hiney y col. 1992) o del gen *VapA* que codifica una subunidad de la proteína A de la capa A (Gustafson y col. 1992) o de un fragmento del gen que codifica al receptor del sideróforo (Beaz-Hidalgo y col., 2008). También se han descrito métodos basados en PCR en tiempo real que permiten la detección cuantitativa de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* en los tejidos del pez (Balcázar y col., 2007; Fernández-Álvarez y col., 2016) y su diferenciación de la subespecie atípicas de *A. salmonicida* subsp. *masoucida* Fernández-Álvarez y col., 2016).

En el caso de *V. anguillarum* se describieron diversas secuencias genómicas que han facilitado el diseño de métodos moleculares de diagnóstico basados en la hibridación (Rehnstam y col. 1989; Martínez-Picado y col. 1994; 1996; Hirono y col. 1996; González y col., 2004). Sin embargo, la técnica de detección por hibridación con sondas es un método largo y tedioso, lo que llevó al diseño de protocolos de PCR que posibilitan la detección rápida del agente causal de la vibriosis a partir del riñón e hígado de los peces infectados, en aproximadamente 4 horas (González y col., 2004).

Todos los sistemas descritos son de utilidad para el diagnóstico confirmativo de la enfermedad, al permitir la identificación de la bacteria previamente aislada en cultivo puro y en algunos casos se ha demostrado la utilidad de estas técnicas para la detección del microorganismo directamente en los tejidos de peces enfermos.

1.2.5.- Prevención de la tenacibaculosis, furunculosis y vibriosis

Los factores ambientales son de vital importancia en la aparición potencial de enfermedades producidas por microorganismos patógenos. Esto destaca particularmente en el medio acuático, en el que el hospedador y el patógeno están influenciados por las fluctuaciones en las condiciones ambientales (Strohl y Tait, 1978; Soltani y Burke, 1994, Soltani y col., 1995). A continuación, se describen algunos de los factores ambientales que afectan en la aparición de enfermedades en peces de cultivo.

Muchos autores han indicado la existencia de relación entre elevadas temperaturas y una mayor prevalencia y/o severidad de una enfermedad (Campbell y Buswell, 1982; McVicar y White, 1982; Devesa y col., 1989; Carson y col., 1992, 1993; Soltani y Burke, 1994).

Las manipulaciones de los peces, derivadas del proceso de producción, como son los muestreos, clasificación, cambio de tanques y los factores estacionales predisponen de manera directa a una mayor mortalidad asociada a enfermedades. (McVicar y White, 1982; Wakabayashi y col., 1986; Bernardet y col., 1994).

El tamaño y la edad del pez también están relacionados con la aparición de enfermedades. Así, las mayores mortalidades normalmente la sufren los juveniles, mientras que en adultos la enfermedad está más asociada a picos de estrés. (Masumura y Wakabayashi, 1977; Hikida y col., 1979; McVicar y White, 1987; Bernardet y col., 1994).

Otros factores que favorecen la aparición de enfermedad como son la superpoblación, la existencia de lesiones u otras enfermedades actúan acentuando el estrés de los peces, debilitando su sistema inmunitario y facilitando el desarrollo de patologías.

Además del control de estos factores se hace necesario el control y el conocimiento de otros factores inherentes al pez y propios de cada enfermedad. Así, los estudios de inmunología de peces se han incrementado notablemente en los últimos años en paralelo al desarrollo de la acuicultura.

El conocimiento del sistema inmunitario es básico para el desarrollo de métodos eficaces de prevención de las enfermedades y se necesitan métodos simples, rápidos y no cruentos para tener una información actualizada de la salud de los peces y detectar una posible inmunosupresión.

El conocimiento del estado del sanitario de los peces y la implantación de protocolos de vacunación adaptados al grado de desarrollo del sistema inmunitario de los peces en cultivo, constituyen uno de los métodos más eficaces para la prevención de enfermedades bacterianas en Acuicultura (Ellis, 1988 a y b; Newman, 1993; Ellis, 1997; Toranzo y col., 1997; Gudding y col., 1999). Los primeros intentos de inmunización de peces datan de 1930, pero fue en 1976 cuando se comercializó la primera vacuna, quizás motivado por la emergente aparición de resistencias bacterianas a antibióticos y al potencial peligro que conlleva el uso de éstos en peces para la alimentación humana (Sakai, 1999). Desde entonces, la atención se centró en el estudio de la respuesta inmune de los peces, en la identificación de los antígenos protectores y en el desarrollo de métodos óptimos de inmunización masiva con el fin de obtener niveles de protección elevados durante un largo período de tiempo (Gudding y col. 1999; 2014; Sommerset y col., 2005). Fruto de estas investigaciones han sido el esclarecimiento de los factores que afectan al desarrollo de la respuesta inmunitaria de los peces y, por tanto, a la eficacia de la vacunación (Ellis, 1988 a y b; Gudding y col. 1999; 2014; Sommerset y col., 2005).

La mayoría de las investigaciones se han centrado en el diseño de vacunas polivalentes y métodos de administración que permitan incrementar la respuesta inmune y la duración de la protección de frente a las enfermedades bacterianas que afectan a los peces durante el proceso productivo, así como en el estudio de los parámetros o factores que pueden tener influencia en la eficacia de la inmunización. Las vacunas polivalentes son de gran interés para la industria piscícola pues reducen costes y la manipulación excesiva de los peces durante su desarrollo en las granjas.

La mayoría de las vacunas utilizadas para peces en la actualidad son formulaciones acuosas inactivadas. En el caso de administración por inyección, las vacunas se emplean con un adyuvante como aceite vegetal o mineral (vacunas adyuvadas) que inducen efectos secundarios deletéreos, mientras que las vacunas aplicadas mediante inmersión son generalmente no adyuvadas. Las vacunas vivas, diseñadas para ser administradas por inyección o inmersión, tienen actualmente un uso limitado. Otro aspecto de interés es el desarrollo de vacunas de ADN para peces. La formulación de las futuras vacunas debe tender a la reducción de los efectos secundarios y a mejorar la respuesta inmune, particularmente frente a patógenos intracelulares.

Con respecto a la vacunación, uno de los primeros sistemas de inmunización masiva descritos fue la administración oral de vacunas incorporadas al pienso (Fryer y col., 1972,

1978; Rohovec y col., 1975) para evitar las situaciones de estrés de los peces por su manipulación. Los resultados obtenidos por Kawai y col. (1981) apoyaban la teoría de que en peces inmunizados por vía oral la protección era debida principalmente a las aglutininas presentes en el mucus superficial, frente a los vacunados por vía intraperitoneal donde se detectaban anticuerpos circulantes.

A pesar de las ventajas teóricas de la inmunización oral, trabajos experimentales y de campo demostraron que la inmunización era de corta duración y no tan efectiva como la inducida por otros métodos de inmunización (Baudin-Laurencin y Tangtronpiros, 1980; Agius y col., 1983; Evelyn, 1984; Smith, 1988), posiblemente, debido a la imposibilidad de controlar la dosis administrada por pez así como, a la inestabilidad de los antígenos en el tracto digestivo. En este sentido Johnson y Amend (1983) han demostrado que la administración por intubación anal de la vacuna da lugar a un incremento del grado de protección de los peces. Sin embargo, los ensayos de microencapsulación de los antígenos han dado pocos resultados (Smith, 1988).

Con el fin de solventar los problemas observados se han evaluado otros métodos como: la infiltración hiperosmótica (Tebbit y Goodrich, 1982; Smith, 1988), la inmersión directa o baño corto (Tebbit y Goodrich, 1982), el baño vacunal (baño largo) y la ducha o "spray" (Tebbit y Goodrich, 1982; Smith, 1988), pero ninguna consiguió resultados satisfactorios.

La vacunación por baño prolongado (dilución directa de la vacuna en el tanque de cultivo) presenta la ventaja frente al baño corto (inmersión de los peces en un depósito que contiene la vacuna diluida) de no tener que manipular a los peces, pero requiere el mantenimiento de éstos durante un largo período de tiempo en pequeños volúmenes de agua, lo que hacía necesario un estricto control de los niveles de oxígeno. Este método de vacunación confiere un grado de protección aceptable y es útil para vacunar un número elevado de peces de pequeño tamaño.

En un futuro próximo deberán desarrollarse procedimientos de inmunización a través de mucosas que permitan mejorar la respuesta inmune protectora en el sitio de entrada del patógeno o en el sitio primario de replicación (Gudding y col., 2014).

Otro aspecto que influye en la eficacia de la vacunación es el efecto de los factores ambientales. Así, Amend y Johnson (1981) estudiando el efecto de la temperatura del agua en el desarrollo de la inmunidad pusieron de manifiesto que los peces mantenidos a temperaturas entre 10 y 18°C desarrollaban inmunidad en un período de 10 días mientras que el mantenimiento de los ejemplares a 4°C producía un retraso de hasta 40 días en la respuesta inmunitaria en truchas vacunadas con bacterinas antivibriosis. Smith (1988) demostró que a temperaturas inferiores a 4°C no existe respuesta del sistema inmunitario de los peces frente a las vacunas por lo que la aplicación de estas sería inefectiva. Este hecho podría explicar el escaso éxito de las vacunas contra vibriosis en zonas como Canadá, Alaska, y países nórdicos.

Vacunas anti-Tenacibaculum maritimum

Contrasta con la furunculosis y la vibriosis el caso de la flexibacteriosis, pues hasta hace relativamente poco tiempo no existía una vacuna comercial para hacer frente a esta enfermedad. En el año 1998 aparece fruto del trabajo de nuestro grupo de investigación (Pazos, 1997; Santos y col., 1999), la primera patente de una vacuna anti flexibacteriosis marina en rodaballo, vacuna FM-95, elaborada con la cepa LPV 1.7 (serotipo O2) de *Flexibacter maritimus* inactivada con formaldehído. Esta vacuna confiere niveles de protección superiores al 70% cuando se administra por inyección y niveles moderados de protección cuando se administra por baño (RPS = 30%). La vacuna FM-95 es la única vacuna

registrada y comercializada (laboratorios HIPRA con la denominación de Icthiovac-Tm) para el control de la flexibacteriosis marina.

En estudios posteriores, Van Gelderen y col (2009) han demostrado que la administración mediante inyección de vacunas oleosas anti-*T. maritimum* en salmón confiere niveles de protección superiores (RPS > 78%) a los obtenidos con las vacunas acuosas (RPS= 27%), pero, se han observado efectos secundarios como depósitos de melanina en el área de inyección y la formación de granulomas.

Hasta el desarrollo de formulaciones vacunales, para evitar brotes de la enfermedad se utilizaban quimioterápicos, pero, aunque en principio el uso de oxitetraciclina o de quinolonas fluoradas permiten el control de las mortalidades, se observan recidivas y se ha descrito la rápida aparición de microorganismos resistentes (Pazos, 1997; Santos y col., 1999). Por todo ello, el desarrollo de métodos inmunológicos de prevención de la flexibacteriosis marina marcó un hito en el tratamiento de la enfermedad, y un avance en el proceso productivo de las plantas.

Vacunas anti-Aeromonas salmonicida

En 1937 se intentó por primera vez la inmunización de los peces contra la furunculosis (Midtlyng y col., 1997). La primera vacuna contra la furunculosis fue diseñada y evaluada por Duff (1942) en salmones. La vacuna consistía en una mezcla de células muertas (con cloroformo) del agente causante de la enfermedad con la dieta (administración oral) (Duff, 1942; Austin y Austin, 1989; Ellis, 1991; Midtlyng, 1997). En los años 50 y 60, los trabajos sobre vacunación no progresaron mucho debido a la aparición de algunos antibióticos potentes contra la furunculosis (Sniesko, 1952; Post, 1959; Evelyn, 1977; Michel, 1982; Midtlyng, 1997).

A principios de los años 60 se reconoce por primera vez que los productos extracelulares de *A. salmonicida* causan efectos tóxicos en los peces, pero su papel como potenciales constituyentes de las vacunas no se investiga hasta el año 1966. A pesar de los prometedores resultados obtenidos a escala de laboratorio, la vacuna no confiere protección a los peces cuando se evalúa a nivel de campo (Midtlyng, 1997).

Durante los años setenta la investigación se centra en el estudio de las estructuras de la superficie celular y factores intra- y extracelulares y su relación con la patogénesis de la furunculosis.

Uno de los primeros componentes analizados son los lipopolisacáridos (LPS). Así, Paterson y Fryer (1974), demuestran que la administración de preparaciones de endotoxinas incrementa los niveles de aglutininas en peces vacunados sin presentar efectos tóxicos. Sin embargo, estudios posteriores llevaron a estos investigadores a la conclusión de que los LPS no eran los componentes inmunogénicos más importantes en una vacuna.

El descubrimiento de la capa A (A-layer) en cepas virulentas de *A. salmonicida* (Uder y Fryer, 1978) hizo que los investigadores se volcasen rápidamente en el análisis de su potencial antigénico. Sin embargo, la inmunización de los peces por vía oral con vacunas que incluían cepas sin (A-) y con la capa A (A+) no confería protección ni se detectaba la presencia en suero de aglutininas.

Posteriormente, Cipriano (1982) investiga las propiedades inmunogénicas de las cepas avirulentas y virulentas de *A. salmonicida* y para ello inmuniza a peces con células inactivadas, células inactivadas y lavadas y con los productos extracelulares obtenidos del sobrenadante de los cultivos. Estos estudios demuestran que todas las preparaciones inducían respuesta aglutinante en los peces vacunados, pero sólo la vacuna de productos extracelulares confería protección frente a la infección experimental por baño.

A partir de entonces todos los estudios encaminados al diseño de vacunas frente a la furunculosis han incluido antígenos celulares y extracelulares.

Otra vía de investigación en vacunas antifurunculosis es la desarrollada por Hirst y Ellis (1994), quienes investigaron el potencial inmunogénico de las proteínas de membrana inducidas cuando las cepas de *A. salmonicida* crecen en condiciones restrictivas de hierro (IROMPS).

Por otra parte, se han realizado estudios para la obtención de vacunas recombinantes. En este sentido, Vaughan y col. (1993) obtuvieron, mediante la manipulación y reinserción del gen *AroA*, un mutante de *A. salmonicida* incapaz de crecer en ausencia de moléculas aromáticas. Los peces inmunizados por vía intraperitoneal con la vacuna elaborada con células vivas de este mutante mostraban aglutininas en suero y un grado de protección aceptable en comparación con los peces control no vacunados. Estudios posteriores (Marsden y Secombes, 1994) han demostrado que esta vacuna recombinante induce una respuesta humoral y celular.

Vacunas anti-Vibrio anguillarum

La primera descripción de una inmunización efectiva contra la vibriosis se debe a Hayashi y col. (1964), quienes demostraron que la vacunación de trucha arcoiris por vía intraperitoneal, incrementaba el grado de protección de los peces frente a esta enfermedad. Asimismo, Harrel y col. (1976) y Evelyn (1984) demostraron que la vacunación por inyección inducía una respuesta inmunitaria generalizada que se traducía no sólo en un aumento considerable de los niveles de anticuerpos en el suero sino también en el mucus superficial e intestinal.

En cuanto a la naturaleza de las vacunas, la mayoría han sido elaboradas con células bacterianas completas inactivadas por calor (Fletcher y White, 1973; Gould y col., 1978; Kusuda y col., 1978 y Agius y col., 1983) o formaldehído (Agius y col., 1978; Fryer y col., 1978; Gould y col., 1978; Kusuda y col., 1978; Nakagima y Chikahata, 1979; Baudin-Laurencin y Tangtrongpiros, 1980; Evelyn y Ketchenson, 1980; Groberg, 1982; Horne y col., 1982; Santos y col., 1991).

Otros estudios de inmunización frente a la vibriosis se han centrado en la caracterización de los componentes antigénicos para peces. Así, algunos autores (Kawai y Kusuda, 1983; Chart y Trust, 1984; Evelyn, 1984) se basaron en los lipopolisacáridos de la envoltura celular. Sin embargo, Bogwald y col. (1991) encontraban que la inmunización de salmón con lipopolisacáridos purificados confería un grado de protección bajo mientras que cuando se inmunizaba a los peces con un complejo de proteínas y lipopolisacáridos se obtenían niveles de protección superiores. Por otra parte, Chart y Trust (1984) aislaron dos proteínas de la envoltura celular bacteriana, una de masa molecular de 49-51 Kd con un elevado potencial inmunogénico y otra de masa molecular de 40 Kd con débil capacidad antigénica (Kusuda y col., 1978; Itami y Kusuda, 1980).

Kanemori y col. (1987) demostraron que una proteasa extracelular producida por *V. anguillarum* desempeñaba un importante papel inmunogénico en la vacunación por inyección intraperitoneal de ayu y anguila. Sin embargo, la inmunización de ayu con este enzima por inmersión producía mortalidades por toxicidad. Este efecto tóxico de los componentes extracelulares había sido previamente observado por Aoki y col. (1981; 1984) y por Kusuda y col. (1980) en alevines de ayu inmunizados mediante inmersión hiperosmótica y por baño, respectivamente.

Santos (1991) demostró que los componentes proteicos presentes en la envoltura celular y en los productos extracelulares son los principales compuestos inmunogénicos para

peces y la existencia de diferencias en la composición de antígenos celulares y extracelulares entre cepas de *V. anguillarum* de los serotipos O1 y O2a y O2b. En base a estos resultados se diseñó una vacuna compuesta por tres cepas bacterianas aisladas a partir de rodaballo, CECT 5031 (O1), CECT 5032 (O2 α) y CECT 5033 (O2 β) y por sus productos extracelulares inactivados con formaldehído que demostró eficacia al ser administrada en rodaballo por baño corto, baño largo e inyección (Santos y col., 1991). Esta vacuna denominada originalmente como GAVA-3 es actualmente comercializada por laboratorios HIPRA bajo la referencia ICTHYOVAC-VR para el control de la vibriosis causada por los serotipos patógenos O1 y O2 (subgrupos O2a y O2b).

También se ha evaluado la eficacia de las vacunas elaboradas con bacterias vivas con variables resultados (Muroga, 1975; Braaten y Hodgins, 1976; Norqvist y col., 1989).

Amend y Johnson (1981), estudiando la talla mínima a la cual se inducía protección en peces salmónidos vacunados por inmersión contra la vibriosis, encontraron que por debajo de los 0,5-1,0 g no se producía una respuesta inmunitaria duradera. Estudios posteriores (Tatner y Horne, 1983) mostraron que la vacunación por inmersión de trucha arcoiris de 2, 4, 6 y 10 semanas resultaba en un incremento del grado de protección de los peces frente a una inoculación por vía intraperitoneal de la bacteria. Posteriormente, Santos y col. (1991) demostraron que la administración por baño de la vacuna GAVA-3 en trucha arcoiris (10g) y rodaballos (1,5g) confería elevados niveles de protección (>75%) frente a los serotipos patógenos (O1, O2a y O2b) de *V. anguillarum*.

1.3.- El sistema inmunitario de peces teleósteos

El sistema inmunitario de los peces presenta una serie de mecanismos de defensa frente a los microorganismos patógenos que actúan de forma complementaria y pueden dividirse en dos tipos: sistema inmunitario innato o inespecífico y sistema inmunitario específico o adquirido (Ellis, 1999; Dixon y Stet, 2001; Watts y col., 2001; Godoy, 2010). Los mecanismos de defensa inespecíficos, presentes en todos los seres vivos desde su nacimiento, están formados por componentes celulares y humorales que se activan en respuesta a propiedades químicas inherentes al agente agresor o elaborados por éste. El sistema inmunitario específico está formado por los linfocitos y sus productos incluidos los anticuerpos. Los mecanismos específicos requieren, al igual que en los mamíferos, una inducción por parte del antígeno, una discriminación de los elementos propios y extraños, una especificidad hacia el antígeno y una memoria inmunológica. La importancia relativa de ambos mecanismos de defensa puede variar con la edad del pez y están influenciados por distintos factores (factores ambientales, parámetros abióticos del agua, etc) (Ellis, 1999; Dixon y Stet, 2001; Watts y col, 2001, Tort y col., 2003; Godoy, 2010; Pradipta y col., 2012; Secombes y Wang, 2012).

1.3.1.-Mecanismos de defensa específicos

Dentro del sistema específico de defensa se encuentra la respuesta humoral específica y la respuesta celular específica. (Tabla 4)

La respuesta humoral específica está representada por los anticuerpos o inmunoglobulinas (Igs) que son glicoproteínas producidas por el pez en respuesta a un antígeno y que aparecen fundamentalmente en el plasma, la sangre y otras secreciones (bilis, mucosas) (Ellis, 1999; Janeway y col., 2005; Nielsen y Esteve-Gassent, 2006). La inmunoglobulina predominante en los peces es una similar a la IgM de mamíferos. Esta IgM

es tetramérica en los teleósteos con dos cadenas ligeras y dos pesadas y una masa molecular de 700 kDa. Más recientemente se han identificado dos isotipos de cadena pesada, IgD y IgT, aunque no han sido completamente caracterizadas funcionalmente (Pradipta y col., 2012). IgD se cree que se encuentra en la membrana de las células B, donde puede actuar como un receptor. También se ha descrito el isotipo IgZ en peces. El isotipo de IgZ/IgT recientemente ha sido encontrado en espinoso (*Gasterosteus aculeatus*) y la carpa (*Cyprinus carpio*) y parece ser un isotipo de cadena pesada único limitado a peces Osteictios (Pradipta, 2012; Secombes y Wang, 2012). La Ig T es responsable de la inmunidad a nivel intestinal.

Existen una serie de factores que influyen en la producción de inmunoglobulinas en los peces, tales como el estado de inmunocompetencia del individuo, la ruta de entrada del antígeno, la naturaleza del mismo, la dosis, la temperatura del agua y el uso de estimulantes.

Al igual que en los mamíferos se puede inducir tolerancia en los peces antes de que éstos se hagan inmunológicamente competentes. Estudios en *O. mykiss* y *Cyprinus carpio* realizados por Ellis (1988b) han demostrado que las células citotóxicas y la producción de anticuerpos contra antígenos T independientes, se desarrollan 4 semanas post-eclosión. La habilidad para establecer una memoria inmunológica y producir anticuerpos contra antígenos T dependientes (requieren cooperación de las células T para la producción máxima de anticuerpos), se desarrolla 8 semanas post-eclosión (Tatner 1986; Ellis y col., 1998; Sommerset y col., 2005). Si se inyectan con un Ag T dependiente antes de este tiempo se produce la tolerancia inmunológica.

La inmunidad celular específica está mediada por la cooperación entre linfocitos, fagocitos mononucleares y moléculas efectoras. En los peces hay una serie de inmunomoduladores cuyas funciones se asemejan bastante a las citoquinas de mamíferos (Pradipta, 2012; Secombes y Wang, 2012, Zou y Secombes., 2016).

Las citoquinas de los peces tienen un papel en el desarrollo y la hematopoyesis. Las citoquinas atraen los leucocitos al sitio de la infección y activan los mecanismos antimicrobianos para matar a los invasores. Influyen en el tipo de respuesta con la clásica respuesta inmune tipo I y tipo II, probablemente controlada por la liberación de las citoquinas apropiadas por parte de las células linfoides o de las células de defensa tipo T, para una respuesta inmune temprana y dirigida a causar el mínimo daño en el pez.

Esta respuesta de las citoquinas podría ser útil como marcador para el estudio de la efectividad de la vacunación en los peces o para la selección de los alevines de los ejemplares más resistentes. (Zou y Secombes., 2016).

También existe un sistema genético polimórfico parecido al complejo principal de histocompatibilidad de mamíferos. Este sistema está implicado en el reconocimiento del antígeno por parte de células accesorias o presentadoras de antígeno. Estas células (monocitos y macrófagos) presentan el antígeno procesado a los linfocitos para activar la respuesta específica.

Tabla 4.- Mecanismos de defensa específicos de los peces

Mecanismos Humorales	Mecanismos Celulares
Anticuerpos	Macrófagos activados
Anti-adhesinas	Linfocitos T específicos/ Antígeno
Anti-toxinas	Citotoquinas (IFN γ , TNF, IL-10, IL-20L, IL22, IL 26, IFN-a,d,e, IFN-b,c,f, IFN- γ rel)
Anti-invasinas	
Activación vía clásica del complemento	

1.3.2.-Mecanismos de defensa inespecíficos

Los componentes del sistema inmune innato de los peces teleósteos desempeñan un importante papel en el control de las infecciones y en la eliminación de los microorganismos patógenos. Los mecanismos de defensa inespecíficos son mecanismos a corto plazo (Tabla 5), incluyen las barreras mecánicas primarias constituidas por los epitelios y su secreción o capa de moco, factores solubles que constituyen la defensa humoral inespecífica y varios tipos celulares que constituyen la defensa celular inespecífica (Tort y col., 2003; Magnodotir, 2006, Godoy, 2010, Pradipta, 2012; Secombes y Wang, 2012, Gómez y col., 2013, Zou y Secombes., 2016).

a.- Barreras mecánicas. Los epitelios que recubren la superficie externa de los animales y su secreción o capa de moco sirven de protección permanente y son la primera línea de defensa, previniendo la colonización por microorganismos.

En teleósteos, el intestino, la piel y las branquias son las principales superficies de la mucosa y las barreras inmunitarias. Los vertebrados inferiores, como los peces cartilaginosos y teleósteos, son los animales más antiguos con un sistema inmune adaptativo basado en anticuerpos, células B y células T. Además, los peces teleósteos son los vertebrados más primitivos donde se han caracterizado anticuerpos específicos en las mucosas.

En las superficies mucosas de los mamíferos, la inmunoglobulina es la IgA, que es producida principalmente por las células plasmáticas presentes en la lámina propia intestinal. De manera similar, el homólogo IgA de teleósteos, IgT / IgZ, tiene un papel preponderante en la inmunidad a nivel de la mucosa intestinal. Adicionalmente, en mamíferos las Igs se exportan a través de barreras epiteliales en el lumen vía el receptor polimérico de la inmunoglobulina (pIgR) expresado por el epitelio. El pIgR también se expresa en el intestino y la piel de los teleósteos y es responsable del transporte de IgM e IgT a través de las barreras mucosas (Gómez y col., 2013).

Entre los mecanismos de defensa innatos presentes en las superficies mucosas, el moco es uno de los más importantes. Las moléculas predominantes en el moco son las mucinas. Además de las mucinas, el moco contiene una mezcla compleja de proteínas compuesta por precipitinas inespecíficas, lisozima, enzimas proteolíticas, proteína C reactiva, las cuales constituyen una barrera de defensa química primaria. También se ha descrito la existencia de aglutininas e inmunoglobulinas específicas en el mucus de animales inmunizados.

b.- Defensa humoral no específica. En el suero existen distintos compuestos capaces de inhibir la multiplicación microbiana como: transferrina, lisozima, lectinas, proteína C reactiva y complemento (Tort y col., 2003; Godoy, 2010, Pradipta, 2012; Secombes y Wang, 2012, Gómez y col., 2013, Zou y Secombes., 2016).

La transferrina es una glicoproteína que puede unirse al hierro y participa en el transporte de este elemento entre las zonas de absorción, almacenamiento y utilización en los organismos vertebrados. La transferrina limita la cantidad de hierro endógeno disponible para los microorganismos patógenos inhibiendo su multiplicación.

La lisozima es una enzima mucolítica con acción antimicrobiana debido a su capacidad para degradar el peptidoglucano de la pared celular bacteriana, particularmente en Gram-positivas, causando la lisis. En bacterias Gram-negativas la enzima actúa después de que el complemento y otros enzimas hayan roto la membrana externa, dejando accesible la capa de peptidoglucano. Además de su acción directa sobre la célula bacteriana, la lisozima promueve la fagocitosis actuando como opsonina y activando a los macrófagos. Se ha detectado en suero, mucus y en tejidos ricos en leucocitos como el riñón, el bazo y el intestino, tanto en peces de agua de mar como de agua dulce. En peces la enzima lisozima actúa como una proteína en fase aguda que es inducida muy rápidamente en respuesta a la presencia de bacterias o ante situaciones de estrés.

Las lectinas o hemagglutininas son proteínas que aglutinan células y/o precipitan glicoconjugados. Se han descrito en el mucus, huevos y suero de muchas especies de peces y se ha sugerido que su acción antimicrobiana es debida a su capacidad de actuar como opsoninas en el proceso de fagocitosis y de activar el complemento. La producción de aglutininas puede verse incrementada tras la exposición a antígenos y/o otras sustancias. Sin embargo, las lectinas son proteínas o glucoproteínas constitutivas que poseen capacidad para unirse a residuos de carbohidratos.

La proteína C reactiva, en contraste con la de mamíferos, puede ser un componente normal del suero, es capaz de unirse a los residuos de fosforil-colina presentes en la membrana celular de varias bacterias, parásitos u hongos causando la aglutinación de éstos (lo que induce su fagocitosis), activan el complemento y pueden actuar como opsoninas. Se produce en respuesta al estrés, manipulación, exposición antigénica, etc.

El complemento está constituido por un conjunto de proteínas séricas que juega un importante papel en la inmunidad humoral y celular. La estimulación del sistema de complemento desencadena reacciones bioquímicas que son acompañadas por la generación de numerosos mediadores biológicamente activos en la inflamación. Los componentes del complemento actúan de forma secuencial participando en la muerte y eliminación de microorganismos patógenos y en la activación de respuestas inespecíficas relacionadas con la inflamación. El sistema de complemento en peces puede ser activado a través de la vía clásica o dependiente de anticuerpo y la vía alternativa o independiente de anticuerpo.

En los peces el sistema del complemento constituye el factor humoral más importante dentro de la inmunidad innata. El complemento de peces difiere del complemento de mamíferos en la temperatura de reacción (menor en peces), por tener un mayor efecto antimicrobiano y por ser más específico de especie y grupo. Otra diferencia es la presencia en peces de múltiples isoformas activas del enzima C3, cuya posible función sea la especialización para unirse a superficies específicas incrementando así la eficacia de eliminación del inmunógeno.

La tripsina y las células que contienen esta proteasa se encuentran en la epidermis, agallas e intestino, lo que indica una producción local y posterior secreción en el mucus de este compuesto.

c.- *Defensa celular no específica.* Las principales células implicadas en los mecanismos de defensa no específicos son las células citotóxicas naturales y las células fagocíticas (Tafalla y Novoa, 2000; Tort y col., 2003; Godoy, 2010, Pradipta, 2012; Secombes y Wang, 2012, Gómez y col., 2013, Zou y Secombes., 2016).

Las células citotóxicas naturales son equivalentes a las células “natural killer” de mamíferos y están implicadas principalmente en la resistencia a protozoos y virus y la lisis de células tumorales. Su actividad depende del contacto directo con las células diana mediante la unión a receptores específicos y se han descrito en sus membranas moléculas necesarias para el reconocimiento de células diana. La actividad citotóxica de los leucocitos puede modificarse por la acción de sustancias que actúan como inmunoestimulantes.

Las células fagocíticas desempeñan un papel fundamental en la defensa frente a microorganismos patógenos. Las principales células implicadas son los neutrófilos, los monocitos y los macrófagos que tienen capacidad para reconocer partículas extrañas (material inerte, antígenos, microorganismos patógenos...) e internalizarlas mediante receptores de membrana dependientes de opsonización (reconocen inmunoglobulinas, complemento o fibronectina) o independientes de opsonización (receptores de mananos y glucanos). Tras la internalización y formación del fagosoma, se produce la destrucción y digestión del material fagocitado gracias a la acción de metabolitos tóxicos (intra o extracelulares) dependientes o independientes del oxígeno producidos por los fagocitos.

Entre los metabolitos tóxicos independientes del oxígeno se encuentran los enzimas bactericidas y péptidos antimicrobianos. Los fagocitos poseen además actividad quitinolítica y proteolítica.

Entre los metabolitos tóxicos dependientes del oxígeno se encuentran el anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales hidroxilo ($-OH$), singletes de oxígeno (1O_2), compuestos halogenados como el ácido hipocloroso ($HOCL$) y compuestos derivados de la interacción del anión superóxido con el óxido nítrico (NO) como son los iones NO^+ o NO^- , dióxido de nitrógeno (NO_2), nitrosotrioles o peroxinitritos ($ONOO^-$). Los intermediarios reactivos del oxígeno se generan por acción de una NADPH-oxidasa ligada a la membrana que se activa tras la estimulación de los fagocitos por contacto con distintos agentes (microorganismos patógenos, péptidos, esferas de látex, ésteres de forbol...). Estas reacciones requieren un elevado consumo de oxígeno y es lo que se conoce como “estallido respiratorio dependiente del oxígeno”. Los compuestos halogenados se generan por acción de la mieloperoxidasa presente en los gránulos citoplasmáticos de los fagocitos en presencia de H_2O_2 e iones de cloro. El NO se genera por acción de la NO sintetasa que puede ser constitutiva o inducible.

Los neutrófilos de peces participan en el proceso inflamatorio y presentan capacidad fagocítica y bactericida gracias a la liberación de enzimas y a la producción de metabolitos tóxicos dependientes del oxígeno.

Los monocitos son células presentes en la sangre que se diferencian en macrófagos cuando se establecen en tejidos. Tienen capacidad fagocítica y presentan actividad esterasa no específica y fosfatasa ácida y alcalina.

Los macrófagos se encuentran en diferentes órganos de los peces, siendo especialmente abundantes en riñón y bazo y en la cavidad peritoneal). Los macrófagos son parte fundamental de la defensa inespecífica, poseen receptores para las inmunoglobulinas y el complemento y tienen un amplio rango de funciones basadas en la producción y secreción de enzimas, péptidos antimicrobianos, especies reactivas del oxígeno y nitrógeno y citoquinas. Además, los macrófagos forman parte de la respuesta inmune específica reconociendo y digiriendo sustancias exógenas, desencadenando la activación de los linfocitos

por liberación de moléculas inmunomoduladoras, presentando antígenos en su membrana mediante moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II.

Tabla 5.- Mecanismos de defensa no específicos de los peces

Mecanismos humorales	Mecanismos celulares
Inhibidores	Neutrófilos
Transferrina	Estallido respiratorio*: especies reactivas del oxígeno.
Antiproteasas	Enzimas
Péptidos antibacterianos	Macrófagos
Lectinas	Estallido respiratorio*: especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno
Lisinas	Enzimas
Proteasas	Péptidos antimicrobianos
Lisozima	Citosinas
Complemento	

Especies reactivas del oxígeno: Anión superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), radicales hidroxilo (-OH), singletes de oxígeno (¹O₂); especies reactivas del nitrógeno: óxido nítrico (NO), iones NO⁺ o NO⁻, dióxido de nitrógeno (NO₂), nitrosotrioles o peroxinitritos (ONOO⁻).

1.4.-Aplicación de la citometría de flujo al estudio de la respuesta inmune

El citómetro de flujo es un aparato capaz de medir componentes y propiedades de células y orgánulos celulares por medio de la interacción de las células que fluyen en flujo continuo con un haz de luz láser. El citómetro de flujo es capaz de describir características físicas o químicas de las células. Los componentes básicos de un citómetro se muestran en la figura 8.

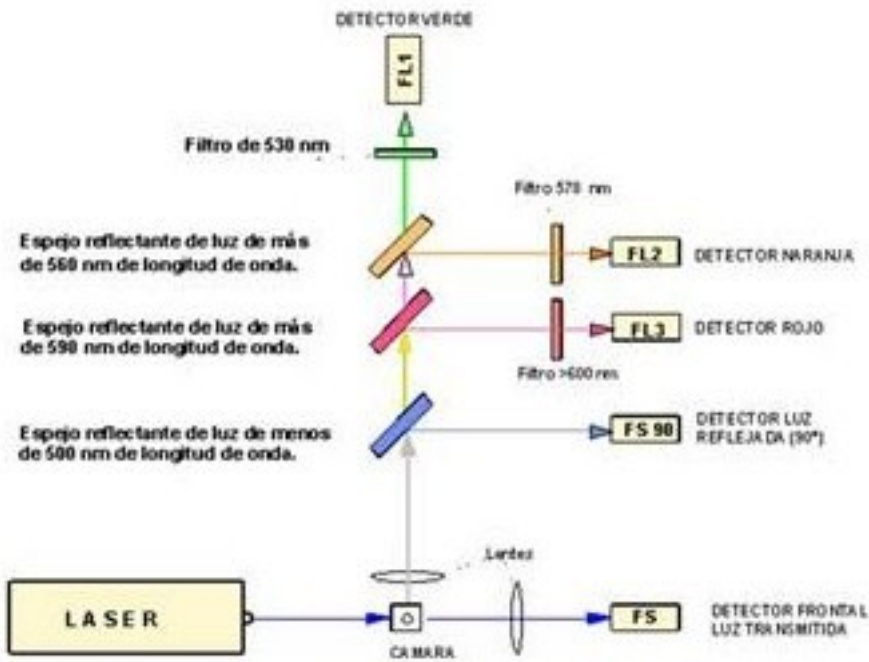


Figura 8.- Esquema básico de un citómetro de flujo.

Dependiendo de si las características pueden o no medirse mediante sondas, los parámetros a analizar se clasifican en cuatro tipos:

- Parámetros estructurales intrínsecos (detectables sin necesidad de sonda): tamaño celular, forma celular, granularidad citoplásmica, fluorescencia de proteínas (triptófano, tirosina), etc.
- Parámetros funcionales intrínsecos (detectables sin necesidad de sonda): estado redox (fluorescencia debida a nucleótidos de flavina y piridina), etc.
- Parámetros estructurales extrínsecos (medida que precisa un marcaje con sondas): contenido en DNA, marcaje de antígenos de superficie, etc.
- Parámetros funcionales extrínsecos: integridad de membrana, actividad de enzimas, síntesis de DNA, potencial citoplásmico/mitocondrial, pH intracelular, etc.

Así las células a estudiar se marcan con compuestos fluorescentes, que se unen específicamente a un constituyente celular, y son capaces de excitarse con una fuente luminosa de alta energía. Se pueden usar varios fluorocromos simultáneamente, que sean excitables con la fuente de luz del láser, de este modo, se pueden medir simultáneamente varios parámetros de una sola célula. De forma general un citómetro de flujo típico es capaz de detectar fluorescencia en cuatro regiones espectrales verde (510-540 nm), amarillo (560-580 nm), naranja (605-635 nm) y rojo (650 nm y por encima). Una célula tarda unos 10 μ s en pasar a través del haz de luz del citómetro de flujo. Durante ese tiempo, los detectores producirán unos pulsos breves que serán convertidos en pulsos de voltaje por los preamplificadores. Es decir, las señales eléctricas analógicas que nos proporciona el citómetro se convierten en señales digitales y son procesadas por un ordenador, con el fin de generar histogramas o citogramas con los parámetros deseados y posteriormente poder efectuar el análisis de los mismos.

Los histogramas o distribución de frecuencias de un solo parámetro (Fig.9A). El eje horizontal de cada histograma indica la intensidad de fluorescencia y el eje vertical representa el número de células con la intensidad de fluorescencia correspondiente. Los histogramas no dan ninguna indicación de correlación entre dos variables relacionadas a nivel de célula individual. Esta forma de representación de la información multiparamétrica se denomina citograma o diagrama de puntos (dot-plot/citograma) (Fig.9B).

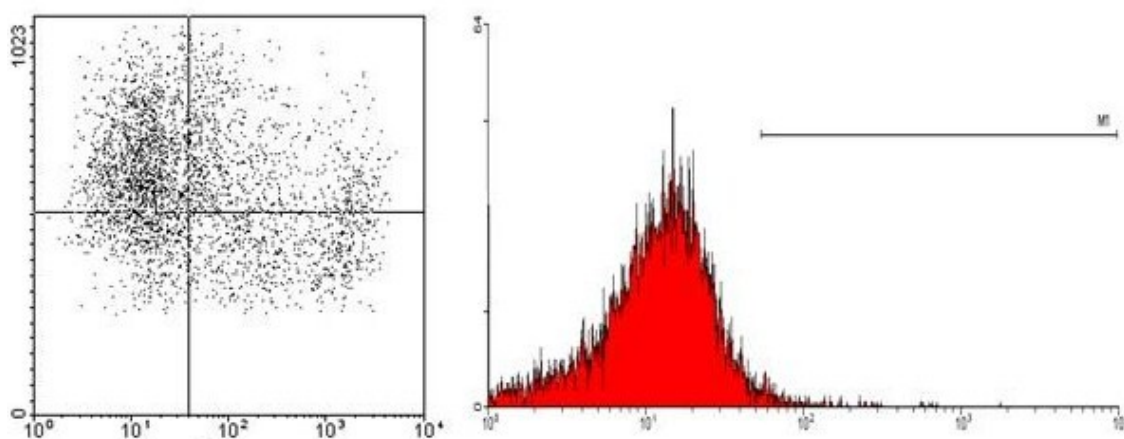


Figura 9.- Esquemas de un histograma (A) y de un diagrama de puntos (citograma biparamétrico) (B).

Además de los datos adquiridos en las diferentes representaciones gráficas, al exportar los datos del citómetro se adquieren en forma de lista. La adquisición de datos en modo de

lista no excluye la generación de histogramas, citogramas o distribuciones multivariantes mientras una muestra se está adquiriendo y además ofrece al usuario la posibilidad de reanalizar los datos después de que sean adquiridos. A su vez, Los programas de análisis de datos permiten la definición de regiones poligonales alrededor de un grupo que, generalmente, es una población celular, por ejemplo los linfocitos T (tiene la ventaja de seleccionar subpoblaciones).

La citometría de flujo (CMF) es una técnica con un gran potencial para el análisis cualitativo y cuantitativo de las funciones y actividades celulares y para estudios hematológicos, patológicos e inmunológicos gracias a la posibilidad de realizar medidas simultáneas de varios parámetros de forma individualizada en un gran número de células, y el de separación celular activada por fluorescencia.

El estudio de la fórmula leucocitaria en sangre de peces puede aportar información relevante sobre su estado de salud y/o inmunocompetencia, sin necesidad del sacrificio del pez. El análisis de este parámetro por citometría de flujo presenta la ventaja de la rapidez y fiabilidad estadística de los resultados debido al elevado número de células estudiadas y además, nos da información sobre la composición cualitativa y cuantitativa de las poblaciones de leucocitos y su actividad celular lo cual podría ser de gran ayuda, al igual que ocurre en mamíferos, en el diagnóstico de enfermedades.

La determinación de la capacidad fagocítica y del estadillo respiratorio mediante CMF puede ser útil para la evaluación de la respuesta inmune en distintas poblaciones de peces. (Secombes, 1996; Castro y col., 1999; Ellis, 1999; Leiro y col., 2000; El Morabit y col., 2006).

Por otra parte, mientras algunos antígenos tienen capacidad estimuladora del sistema inmunitario provocando la proliferación de leucocitos, otros pueden tener un efecto inmunosupresor, debido en parte a la inducción de apoptosis. La proliferación leucocitaria en respuesta a compuestos mitógenos (lipopolisacáridos bacteriano, fitohemaglutinina de plantas,...), es similar a la respuesta observada tras la exposición a antígenos, pero no requiere la acción de las células presentadoras de antígeno (Fernández, 2002). Los ensayos de proliferación celular permiten determinar la variación en el contenido de ADN durante el ciclo celular y, en base a ello, valorar el estado global de la respuesta celular de un animal y diagnosticar si éste ha estado expuesto previamente a un microorganismo por vacunación o infección natural. El estudio de la proliferación de leucocitos en peces teleósteos requiere la utilización de condiciones de cultivo óptimas para la realización del ensayo (Rosenberg-Wiser y Avtalian, 1982; DeKoning y Kaattari, 1991) y la utilización de agentes capaces de estimular la proliferación de células que no hayan tenido una exposición previa a dicho compuesto. Sin embargo, existe poca información respecto al efecto de la exposición a patógenos o de la inmunización sobre el ciclo celular y pocos investigadores han aplicado la CMF para su evaluación (Chilmonczyk y Monge, 1999).

También resulta útil la citometría de flujo para el estudio de los diferentes aspectos de la necrobiología, asociados con la muerte celular. Se describieron numerosos métodos basados en cambios en la morfología celular, estructura y función de la membrana plasmática, en la función de los orgánulos celulares, en la estabilidad y fragmentación del ADN para identificar células apoptóticas y necróticas. Algunos de los métodos para diferenciar células viables de células que están sufriendo apoptosis o necrosis, son:

- Alteraciones en el tamaño y complejidad. La capacidad de las células de dispersar la luz se ve alterada durante la muerte celular. La necrosis celular está asociada con un incremento inicial seguido de una rápida disminución de la capacidad de la célula para dispersar la luz simultáneamente en ambas direcciones (FSC, SSC).

- Evaluación de la actividad de caspasas en células apoptóticas. Puede estudiarse mediante anticuerpos contra caspasa activa o contra productos hidrolizados por las caspasas (se comercializan anticuerpos anti-caspasa-3 activa). La conjugación del anticuerpo con un fluorocromo, nos permite marcar células y estudiarlas por citometría de flujo. También puede ser detectada utilizando un sustrato de caspasas fluorogénico capaz de entrar en células intactas. Por último, un método que se basa en el uso de inhibidores de caspasas marcados con un fluorocromo (fluorochrome-labeled inhibitors of caspases, FLICA) (Smolewski P, 2001). FLICA penetra a través de la membrana plasmática de las células viables sin resultar tóxico para la célula.

- Alteraciones del potencial de membrana mitocondrial. La mitocondria juega un papel fundamental en la apoptosis pues en su núcleo central es donde se activa o no la apoptosis (Kroemer G, 1997; Green DR y Kroemer G, 1998; Green DR y Reed JC, 1998). La apertura de poros en la membrana resulta de la distribución asimétrica de protones a ambos lados de la membrana interna mitocondrial, que se conoce como transición del potencial transmembrana mitocondrial y es un paso temprano de la apoptosis que se manifiesta con una pérdida de la capacidad de la célula para acumular estos fluorocromos en las mitocondrias y ocurre antes de la fragmentación de DNA nuclear (Marchetti P, 1996). Este fenómeno puede medirse por citometría de flujo utilizando distintos marcadores como la rodamina 123.

- Medida de la cantidad de ADN celular. Proporciona información del ciclo celular de las células no apoptóticas.

Aunque la CMF es utilizada de forma rutinaria para la realización de este tipo de estudios en mamíferos, existen muy pocos trabajos en los que se haga uso de esta técnica para la investigación de aspectos funcionales del mecanismo de defensa celular en peces y moluscos (Esteban y col., 1998; Chilmoneczyk y Monge, 1999, Stosik y col., 2002; Cárdenas y col., 2004; El Morabit y col., 2006; Bassity y Clark, 2012).





2. OBJETIVOS

La preservación del estado de salud de las especies en cultivo sigue siendo un tema prioritario para el desarrollo de la acuicultura. Como ocurre en otras áreas de la producción animal, las enfermedades infecciosas son un riesgo en los sistemas de cultivo de peces, con el potencial de causar grandes pérdidas económicas, asociadas directamente a las mortalidades o a la reducción del valor comercial del pescado como alimento para los seres humanos. El conocimiento de los agentes etiológicos de las enfermedades que afectan al rodaballo (*Scophthalmus maximus*) y lenguado (*Solea senegalensis*) en cultivo y del sistema inmune de estas especies es esencial para el desarrollo de medidas de prevención eficaces. Por todo ello, en el presente trabajo se han planteado los siguientes objetivos:

- Caracterización fenotípica, serológica y molecular de cepas bacterianas aisladas a partir de lenguados y rodaballos enfermos y evaluación de su grado de virulencia para peces.
- Optimización de técnicas, basadas en espectrofotometría y en citometría de flujo, para el estudio de la respuesta inmune no específica del rodaballo y lenguado.
- Evaluación del efecto de la infección bacteriana sobre la respuesta inmunitaria de los peces.
- Evaluación de factores que afectan a la eficacia de la vacunación frente a la flexibacteriosis, furunculosis y vibriosis en rodaballo y lenguado.



3. ESTUDIO DE LAS PRINCIPALES PATOLOGÍAS QUE AFECTAN AL RODABALLO Y LENGUADO

3.1.-Materiales y Métodos

3.1.1.-Cepas bacterianas: Origen, aislamiento y conservación

Las cepas utilizadas en el presente estudio han sido aisladas en piscifactorías de la Comunidad Autónoma de Galicia, a partir de rodaballo (*Scophthalmus maximus*) y de lenguado (*Solea senegalensis*) cultivados. Los muestreos se realizaron durante el período 2002 al 2007 para el rodaballo y durante el periodo 2004 al 2006 para el lenguado. Además, se han utilizado cepas bacterianas aisladas a partir de lenguados enfermos cultivados en otras piscifactorías de la península, que han sido donadas por la empresa Skreeting (Cojobar, Burgos), y cepas de referencia de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), de la Colección de Bacterias Marinas e Industriales (NCIMB) y de la colección de nuestro laboratorio (Tabla 6).

El aislamiento bacteriano se realizó por siembra directa en medio sólido a partir de órganos internos (hígado, riñón anterior y bazo) de peces enfermos y de úlceras externas, previo sacrificio de los animales mediante sobredosis (200 mg/L) del anestésico Tricaína Metanosulfonato (MS222, Sigma). Los medios empleados para el aislamiento fueron Tripticasa Soja Agar (Pronadisa) con 1% de cloruro sódico (TSA-1), Agar de Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa (TCBS, Oxoid), Agar Marino (MA, Pronadisa) y Medio para *Flexibacter maritimus* (FMM, Pazos y col., 1993). Las placas se incubaron entre 24 horas y 3 días a 20°C, aislando posteriormente las colonias más representativas en TSA-1 y FMM para la obtención de cultivos puros.

Todas las cepas se mantuvieron en viales comerciales de congelación Microbank™ (Prolab Diagnostics, Ontario, Canadá) a una temperatura de -80 °C, hasta su uso.

3.1.2.- Caracterización taxonómica

Para la identificación de las cepas se utilizaron los métodos convencionales en tubo y placa, y los sistemas multiprueba API 20E para el caso de las bacterias Gram-negativas aeróbicas facultativas y API ZYM para el grupo de las bacterias filamentosas (BioMérieux, España).

3.1.2.1-Estudios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos

Métodos convencionales en tubo y placa

Los aislados bacterianos fueron sometidos a una serie de pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, siguiendo los procedimientos descritos por Alsina (1994), Bernardet y col., (2002) y Buller, (2014). Excepto que se especifique lo contrario, los medios utilizados para la caracterización de bacterias filamentosas se prepararon en agua de mar. En los ensayos se emplearon suspensiones bacterianas, ajustadas por comparación de turbidez con el tubo N° 3 de la escala McFarland, a una concentración de 9×10^8 UFC/ml.

Tabla 6.- Cepas bacterianas utilizadas en el presente estudio

Cepas (serotipo)	Origen
<i>Vibrio pelagius</i>	
ATCC 25916	Agua de mar
Lp-51 (A)	<i>S. maximus</i> , España
<i>Vibrio splendidus</i>	
ATCC 33125	Pez marino
95-3-72 (F)	<i>Gadus morhua</i> , Dinamarca
<i>Vibrio anguillarum</i>	
R-82 (O1)	<i>Scophthalmus maximus</i> , España
RG-111 (O2α)	<i>S. maximus</i> , España
RV-22 (O2B)	<i>S. maximus</i> , España
ATCC 43307 (O3A)	<i>Oncorhynchus mykiss</i> , Dinamarca
B 1.1.12/4 (O2 B)	Agua de mar, Dinamarca
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	
ATCC 33539	<i>Chromis punctipinnis</i> , USA
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	
TO96 7.1	<i>S. maximus</i> . Portugal
IA5 06-1	<i>S. maximus</i> . España
<i>Tenacibaculum maritimum</i>	
NCIMB2153 (O1)	<i>Acanthopagrus schlegeli</i> ; Japón
LL01 8.3.8 (O1)	<i>Solea senegalensis</i> , España
LPV1.7 (O2)	<i>S. maximus</i> , España
LM027.5.4 (O3)	<i>S. maximus</i> , España
Q02.10.1.2 (O4)	<i>S. maximus</i> , España
*Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), de la Colección de Bacterias Marinas e Industriales (NCIMB)	

La temperatura de incubación fue de 20°C y la lectura final de los resultados se realizó entre las 72 horas y los 15 días. Los caracteres determinados fueron los siguientes:

* Morfología, y movilidad por microscopía utilizando frotis de cultivos frescos.

*Carácter Gram: se determinó tanto por tinción como por el método Buck (1982).

*Citocromo-oxidasa: prueba efectuada siguiendo el método de Kovacs (Kovacs, 1956). Los aislados que presentaron sistema citocromo-oxidasa actuaron antes de 10 segundos sobre el reactivo, virando a un compuesto oxidado de color violeta.

*Catalasa: se determinó por adición de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3% (v/v) sobre un cultivo de 72 horas de bacteria. La formación inmediata de burbujas indica una reacción positiva.

*Producción de indol: Se determinó por adición de unas gotas de reactivo de Kovacs, sobre un cultivo en caldo triptona (1% p/v). La aparición de anillo rojo en la superficie del medio tras la adición del reactivo se consideró indicativo de la producción de indol a partir de triptófano.

*Prueba de Voges-Proskauer: determina la capacidad de los microorganismos de producir acetoina a partir de la fermentación de la glucosa. La prueba se realizó sembrando las cepas en medio de cultivo suplementado con 0,7% (p/v) de peptona y 0,5% (p/v) de

glucosa. Después de incubar 7 días a 20°C se añadieron los reactivos α -naftol (al 5% (p/v) en etanol) e hidróxido potásico (KOH al 40% (p/v)). se consideró como reacción positiva la aparición en la superficie del medio de un anillo marrón-rojizo.

*Prueba del rojo de metilo: con esta prueba se determina la capacidad del microorganismo para producir y mantener estables los productos terminales ácidos resultantes de la fermentación de la glucosa. Se utilizó el mismo medio de cultivo que en la prueba anterior. Tras la incubación de siete días se añadieron unas gotas del reactivo rojo metilo (0,02% (p/v) en etanol al 55% (v/v)). Se consideró una reacción positiva si el colorante se mantenía rojo en la superficie del medio (indicativo de pH próximo a 4) y negativa si el color producido es amarillo (pH>6).

*Reducción de nitratos: se realizó en medio líquido suplementado con 0,1% (p/v) de nitrato potásico. Las cepas bacterianas se inocularon en 5ml de medio y al cabo de 7 días se les añadió los reactivos α -naftilamina al 0,5% (p/v) y ácido sulfanílico al 0,8% (p/v). La aparición de un color rojizo indicó una reacción positiva debida a la presencia de nitritos en el medio. En los tubos negativos (amarillos) se añadió zinc en polvo para confirmar la presencia de nitratos no reducidos, en cuyo caso se producía el cambio a color rojo.

*Producción de glucano galactosamina: la producción de este polisacárido extracelular se hizo por adición sobre el medio de cultivo, de una solución de rojo Congo al 0,01% (p/v). Transcurrido un minuto se lavó la superficie 2 veces con agua destilada. Las bacterias productoras de glucano galactosamina absorben el colorante y las colonias se observan de color rojo tras el lavado.

*Producción de SH_2 : la producción de ácido sulfhídrico a partir de los aminoácidos que contienen azufre se detectó utilizando una pequeña tira de papel de filtro impregnada en acetato de plomo y suspendida sobre un cultivo denso de la bacteria en 5 ml de medio líquido suplementado con 5% (p/v) de peptona. Los tubos se incubaron a 20°C durante 15 días. La reacción positiva consiste en un ennegrecimiento de la tira de papel.

* Producción de pigmento: La presencia de pigmentos del tipo de la flexirrubina fue detectada suspendiendo una fracción tomada de un cultivo fresco en agar FMM, sobre una gota de KOH al 20% (p/v) (Reichenbach y col., 1980). El cambio inmediato de color (de amarillo a marrón rojizo) de las células bacterianas indica la producción de pigmentos tipo flexirrubina.

* Metabolismo oxidativo-fermentativo: Se determinó inoculando cada cepa por duplicado en tubos con medio O/F (Difco) o medio ZOF [Caldo Marino 2216-E como medio basal, suplementado con un 0,3 % (p/v) de agar, un 0,05% (p/v) de Tris, 1% (p/v) de glucosa y 0,002 % (p/v) de rojo fenol] descrito por Lemos y col. (1985). Uno de los tubos se mantuvo en anaerobiosis recubriendo la superficie del medio con parafina líquida estéril. Los tubos se incubaron durante 15 días. La reacción que indicó que la bacteria poseía un metabolismo de tipo fermentativo consistió en la aparición de color amarillo en el tubo cubierto con parafina o en ambos tubos debido al crecimiento de las bacterias con la consiguiente acidificación del medio, que en origen era verde. Si sólo se produjo acidificación en el tubo aeróbico, se consideró que el organismo utilizaba el carbohidrato por oxidación.

*Actividades enzimáticas: se determinó la producción de varias enzimas mediante la técnica de difusión radial en placa:

Hidrólisis de gelatina: esta actividad se evaluó en medio sólido suplementado con 1%(p/v) de gelatina. Se incubó la placa durante 5 días y se reveló añadiendo cloruro de mercurio al 1% (p/v) en agua destilada sobre la superficie de las placas inoculadas. Se consideró resultado positivo la aparición de halos claros alrededor de las colonias bacterianas.

Producción de esterasas: se determinó en medio sólido suplementado con 1% (v/v) de Tween 80 ó de Tween 20. La aparición de un halo opaco en torno al inóculo indicó la producción de enzima.

Hidrólisis de almidón: la producción de amilasas se determinó en medio sólido suplementado con 1% (p/v) de almidón. Al cabo de 5 días de incubación se revelaron por adición de Lugol. La presencia de halos claros en torno a las colonias indica la producción de amilasas.

*Producción de ácido a partir de azúcares y polialcoholes: las bacterias se sembraron en el medio O/F de Hugh y Leifson o en medio FMM suplementado con rojo fenol al 0,002% (p/v), agar al 0,3% (p/v) y los correspondientes sustratos a una concentración final del 1% (p/v). Se examinó la utilización de los siguientes azúcares; glucosa, sacarosa, fructosa, ramnosa, manosa, maltosa, lactosa, ribosa, salicina, glicerol, sorbitol, manitol e inositol.

*Crecimiento a distintas temperaturas: el crecimiento a diferentes temperaturas se determinó en medio sólido y medio líquido, incubando los cultivos a las temperaturas de 4°C, 15°C, 20°C, 25°C, 37°C y 44°C durante un período de 15 días. En el caso de la determinación del crecimiento en el medio líquido éste se determinó por turbidez.

*Crecimiento en medio con NaCl: se evaluó en caldo de Soja tripticaseína (TSB) suplementado con diferentes concentraciones de NaCl (0, 0,8%, 1%, 3%, 5%, 7% y 10%; p/v). Los tubos se incubaron a 20°C con agitación constante durante 15 días. El crecimiento se determinó por turbidez.

*Crecimiento en medio Marino: se determinó utilizando los medios comerciales caldo y agar marino preparados según las indicaciones del fabricante. Los cultivos se examinaron durante un período de 15 días. El crecimiento se determinó por turbidez.

*Sensibilidad a agentes antimicrobianos: La sensibilidad de los aislados a diferentes agentes quimioterápicos se evaluó por el método de difusión en placas utilizando los medios FMM (bacterias filamentosas) o Mueller Hinton Agar (MHA), según la metodología descrita por Barry y Thornsberry (1991). Los agentes antimicrobianos (Oxoid) empleados en la realización de los antibiogramas así como sus concentraciones (expresadas en µg/disco) fueron: Ampicilina (AMP, 10), Novobiocina (Nv, 30), Oxitetraciclina (OT, 30) y el agente vibriostático Pteridina (O129, 150). Debido a que nuestras cepas han sido aisladas a partir de peces, no se han seguido los criterios clínicos para la interpretación de los resultados. En este estudio la aparición de un halo de inhibición del crecimiento en torno al disco se consideró indicativo de la sensibilidad de la bacteria al agente antimicrobiano independientemente del diámetro del mismo.

Sistemas multiprueba

Se utilizaron dos sistemas multiprueba diferentes en función del tipo de bacteria que tuviéramos que analizar.

* El sistema *API ZYM* está diseñado para detectar y cuantificar la presencia de 19 enzimas. Este sistema se utilizó para la caracterización de las bacterias filamentosas aisladas durante el estudio. Las bacterias crecidas en agar FMM se suspendieron en agua de mar a una concentración de $9 \cdot 10^8$ bacterias/ml, se añadieron 35 µl de cada suspensión bacteriana en cada una de las 20 cúpulas de la galería. Transcurrido el período de incubación (18 h a 25°C) se añadieron los reactivos ZYM A [25% Tris (p/v), 11% (v/v) HCl al 37% y 10% (p/v) SDS (Dodecil Sulfato Sódico), en agua destilada] y ZYM B [0,35% Fast Blue BB (p/v) en 2-Metoxi-Etanol]. La presencia de actividad enzimática se determinó por comparación del color de las reacciones observadas con respecto a la escala de lectura que suministra el fabricante.

*El sistema *API 20E* consta de 20 pruebas y fue utilizado para la caracterización de bacterias Gram-negativas aeróbicas facultativas. A partir de los cultivos en TSA-1%, se prepararon suspensiones en solución salina (0,9% NaCl), ajustando las concentraciones por turbidez al tubo nº 3 de la escala McFarland. El sistema se inoculó siguiendo las instrucciones del fabricante. Las galerías se incubaron a 20 °C durante 24-48 horas. Al cabo de este tiempo se realizó la lectura por comparación con la escala de color que suministra el fabricante.

3.1.2.2.-Serotipado de las cepas mediante aglutinación

La caracterización serológica de las cepas se realizó mediante la técnica serológica de aglutinación en portaobjetos utilizando antisueros policlonales y suspensiones de antígeno “O”. En la tipificación se han utilizado los antisueros frente a las células bacterianas completas inactivadas con formol, de las especies bacterianas reflejadas en la Tabla 6 y que se relacionan a continuación: anti-*Vibrio anguillarum* (serotipos O1, O2 y O3), anti-*Vibrio splendidus* (serotipo F) y anti-*V. pelagius* (serotipo A), anti-*P. damsela* subsp. *piscicida*, anti-*A. salmonicida* y anti-*T. maritimum*, (serotipos O1, O2, O3 y O4). Para la preparación de los antígenos, las cepas aisladas se cultivaron en medio TSA-1 (bacterias Gram-negativas aeróbicas facultativas) o en medio FMM (bacterias filamentosas) durante 48 h a 20°C. Finalizado el tiempo de incubación se suspendieron las células en tampón fosfato salino (PBS, pH 7,4) a una concentración aproximada de 10⁹UFC/ml (escala de McFarland y se sometieron a calentamiento a 100°C durante 1 hora para la obtención del antígeno “O”.

Para el ensayo de aglutinación en portaobjetos se mezclaron en un portaobjetos volúmenes iguales de las suspensiones de antígeno “O” y el antisuero diluido 1/10, siguiendo el procedimiento descrito por Toranzo y col. (1987) y Santos y col. (1995). La aparición de una aglutinación rápida y clara antes de un minuto se consideró como una reacción positiva. La ausencia de aglutinación o una aglutinación débil después de 5 min, se consideró una reacción negativa. Como controles negativos se utilizaron las suspensiones antigénicas mezcladas con suero de conejo no inmunizado y con PBS.

3.1.2.3.- Identificación mediante métodos moleculares

La identificación microbiológica de los aislados se confirmó mediante métodos moleculares basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), siguiendo la metodología descrita previamente para *T. maritimum* (Cepeda y col., 2003), *V. anguillarum* (González y col., 2004) y *P. damsela* subsp. *piscicida* (Osorio y col., 1999). En la Tabla 7 se reflejan los cebadores y condiciones de amplificación utilizados en los ensayos. El análisis de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en cubeta horizontal (100 V/1h) empleando geles de agarosa (tipo II, Sigma) al 1% (p/v) en tampón Tris ácido acético EDTA (TAE, 40mM Tris, 20mM ácido acético, 1mM EDTA, pH 8,3) con Red Safe (INTRON, 20.000x). Los productos de amplificación se visualizaron utilizando un transiluminador de luz ultravioleta (BioRad UV Transilluminator 2000) y se fotografiaron usando una cámara Canon G9.

3.1.3.- Peces utilizados, centro de experimentación y condiciones de mantenimiento

Se han utilizado rodaballos y lenguados sanos, provenientes de piscifactorías de Galicia. Todos los ensayos de experimentación con peces han sido realizados en el

Animalario experimental de la Facultad de Biología de la Universidad de Santiago de Compostela (REGA ES150780263301), en el marco del proyecto de experimentación animal con autorización número 15004/16/004. En los estudios con animales de experimentación incluidos en esta tesis se han tenido en cuenta las consideraciones legales y técnicas recogidas en el R.D. 53/2013 del 1 de febrero, BOE nº 34, del 8 de febrero, en el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos. Los ensayos de experimentación animal han sido realizados por la Profesora Ysabel Santos Rodríguez, codirectora de la tesis.

Antes del inicio del experimento, los peces se aclimataron durante 15 días en el Animalario experimental, en tanques cuadrados (115 x 96x 65 cm) con una carga de biomasa inferior a 15 Kg/m².

Las condiciones de mantenimiento de los peces fueron: salinidad de 32‰, oxígeno disuelto mayor o igual a 8 mg·l⁻¹, temperatura del agua de 16°C para el rodaballo y 18°C para el lenguado, y un caudal de flujo abierto de 15 L/Kg/hora. Los peces fueron alimentados “ad libitum” con pienso comercial. Las operaciones de mantenimiento de los peces fueron realizadas por el personal autorizado del animalario.

3.1.4.- Ensayos de virulencia en peces

Con el fin de determinar cuáles de los microorganismos aislados representan un peligro potencial para los cultivos de peces planos, se procedió a la realización de infecciones experimentales, utilizando cepas representativas de las especies bacterianas aisladas con mayor frecuencia a partir de lenguado y rodaballo.

Para la realización de las infecciones experimentales, las cepas utilizadas en el estudio se cultivaron en el medio apropiado durante 24-48 horas, se recogieron en solución salina estéril, se lavaron por centrifugación y se suspendieron en solución salina estéril con una turbidez similar a la del tubo número tres de la escala McFarland. El número de bacterias viables presentes en el inóculo se determinó por siembra directa en placas de TSA-1 (*V. splendidus*, *V. pelagius*, *V. alginolyticus*, *A. salmonicida*) y agar FMM (*T. maritimum*).

Los peces utilizados para realizar las infecciones experimentales fueron lenguados (peso medio 5±1g y 15±1 g) y rodaballos (peso medio 30±1 g, 250±10g y 500±20 g), mantenidos en el animalario experimental de la Facultad de Biología en tanques de 100 litros de agua de mar a 18°C, con aireación continua. Los peces se anestesiaron con MS222 (Sandoz) (100 mg/ml) y se inyectaron intramuscularmente con 0,1 ml de las suspensiones bacterianas, con un rango de concentraciones estimado entre 10² a 10⁹ UFC/ml. Las mortalidades se contabilizaron diariamente durante un período de 21 días y se consideraron causadas por el microorganismo inoculado cuando éste se recuperaba en cultivo puro a partir de órganos internos.

Dado que existen resultados conflictivos con respecto a cuál es la ruta de infección ideal para demostrar la virulencia de las cepas de *T. maritimum*, en el presente estudio se han realizado infecciones experimentales en lenguado utilizando una cepa del serotipo O1 y diferentes vías de administración. Las vías de administración ensayadas fueron el baño (inm) de 1h en la suspensión bacteriana utilizando aireación extra para mantener las buenas condiciones del tanque, la inyección intramuscular (i.m) y la inyección subcutánea (i.sc) de 0,1 ml de la suspensión bacteriana en el seno dorsal medio (SDM) (insertando la aguja a 2mm de profundidad en la línea media dorsal en un ángulo de 30° justo posterior a la inserción de la aleta dorsal (Failde y col 2014)

3.2.-Resultados

3.2.1.- Identificación mediante métodos convencionales y sistemas multiprueba

La mayoría de los microorganismos aislados durante el período en estudio asociados a mortalidades en las fases de destete y preengorde de lenguado y rodaballo cultivado en Galicia se engloban en los géneros *Vibrio* (46% de aislamientos en lenguado y un 8.3% en rodaballo), *Tenacibaculum* (31% de aislamientos en lenguado y un 81% en rodaballo), *Pseudomonas* spp. (15% aislamientos en lenguado), *Aeromonas* spp (6% de aislamientos en lenguado y 8,3% en rodaballo) y *Moraxella-Acinetobacter* (3% de aislamientos en lenguado y un 2,2% en rodaballo) (Figura 10).

La identificación a nivel de especie de los aislados se llevó a cabo siguiendo los esquemas taxonómicos de Alsina y col., 1994; Pazos, 1997; Bernardet y col., 2002 y Buller, 2014. El conjunto de las pruebas de caracterización fenotípica efectuadas nos permitió identificar a las cepas aisladas en nuestra área geográfica como *Tenacibaculum maritimum* (48 cepas), *Vibrio. alginolyticus* (5 cepas), *Vibrio harveyi* (3 cepas), *Vibrio splendidus* (biotipo I) (8 cepas), *Vibrio splendidus* (biotipo II) (2 cepas), *Vibrio pelagius* (biotipo I) (8 cepas), *V. pelagius* (biotipo II) (2 cepas), *Vibrio natriegens* (2 cepas) y *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* (3 cepas). Los restantes aislados (5,5 % cepas aisladas de rodaballo y 15,6% de los aislados de lenguado) solo pudieron identificarse a nivel de género. En la Tabla 8 se muestra el porcentaje de cepas de cada especie bacteriana aisladas a partir de lenguados y rodaballos cultivados en Galicia.

Es importante señalar que entre las cepas de *Vibrio* aisladas con mayor frecuencia en este estudio, se encuentra *Vibrio splendidus* (11,3% de los aislados de lenguado y 5,5% de los aislados de rodaballo), *V. pelagius* (14,7 % de los aislados de lenguado), *V. alginolyticus* (7,3% de los aislados de lenguado) y *V. harveyi* (2,9% de los aislados de lenguado y 2,8% de los aislado de rodaballo).

En las Tablas 9 y 10 puede observarse que la frecuencia de aislamientos aumentó en paralelo con el incremento de las temperaturas durante los períodos de mayo a septiembre del 2005 y de abril a mayo de 2006. Sin embargo, no se ha observado incremento en la diversidad de especies bacterianas aisladas en función del período de muestreo.

Por otra parte, las cepas en estudio aisladas de lenguado cultivado en otras áreas de la península Ibérica se englobaron en los géneros *Vibrio*, *Photobacterium* y *Tenacibaculum*. Estas cepas fueron identificadas como *V. anguillarum* (2 aislados), *V. splendidus* biotipo I (1 aislado), *V. splendidus* biotipo II (1 aislado), *V. alginolyticus* (1 aislado) y *P. damsela* subsp. *piscicida* (1 aislado). Los ensayos de susceptibilidad a agentes antimicrobianos demostraron que, independientemente de su origen, los aislados pertenecientes al género *Vibrio* fueron sensibles a todos los agentes antimicrobianos probados, excepto la Ampicilina. De modo similar todos los aislados de *Tenacibaculum* mostraron sensibilidad a todos los agentes probados. Por el contrario las cepas de *Aeromonas* y *Photobacterium* fueron resistentes al agente vibriostático Pteridina.

Tabla 1.- Cebadores y condiciones de amplificación utilizadas en la reacción de PCR para la caracterización de las cepas bacterianas.

Bacteria	Cebadores ^a	Condiciones de amplificación ^b					Nº de ciclos	Tamaño fragmento (pares bases)
		Precal.	Desnat.	Hibrid.	Exten.	Exten Final		
<i>T. maritimum</i>	Mar1 (5`-TG TAGCTTGCTACAGATGA-3`) Mar2 (5`-AAATACCTACTCGTAGGTAC-3`)	94°C/2 min	94°C/2 seg.	54°C/2 seg	72°C/10 seg	72°C/4 min	40	400
<i>V. anguillarum</i>	rpoN-ang3 (5`-GAGCAGATCAATATGTTGGATC-3`) rpoN-ang 5(5`- GTTCATAGCATCAATGAGGAG-3`)	95°C/3 min	95°C/1 min.	62°C/1 min	72°C/40 seg	72°C/5 min	30	519
<i>P. damsela</i> . subsp. <i>piscicida</i>	Car1 (5`-GCTTGAAGAGATTGAGT-3`) Car 2 (5`-CACCTCGCGTCTTGCTG-3`)	94°C/2 min	95°C/1 min.	65°C/1 min	72°C/90 seg	72°C/5 min	30	267

^a Los cebadores *Mar1* y *Mar 2*`, flanquean un fragmento de 400 pb del gen *RNAr* 16S de *T. maritimum*; los cebadores *rpoN-ang3*`y *rpoN-ang5*`, flanquean un fragmento de 534 pb del gen *rpoN* de *V. anguillarum*. que codifica el factor sigma celular σ^{54} ; Los cebadores *Car1* y *Car 2*`, flanquean un fragmento de 267 pb del gen *RNAr* 16S de *P. damsela* subsp. *piscicida*. Precal., Precalentamiento; Desnat., desnaturalización; Hibrid., Hibridación; Esten., Extensión; Esten. Final, Extensión final.

Tabla 2.- Especies bacterianas aisladas a partir de rodaballo y lenguado cultivados en piscifactorías de Galicia.

Especies bacterianas	Nº de cepas aisladas de rodaballo (2002-2007)	% aislados por especie bacteriana	Nº de cepas aisladas de lenguado (2004-2006)	% aislados por especie bacteriana
<i>Tenacibaculum maritimum</i>	28	77,8	18	26,4
<i>Tenacibaculum</i> spp	1	2,8	3	4,4
<i>Vibrio alginolyticus</i>			5	7,3
<i>Vibrio. harveyi</i>	1	2,8	2	2,9
<i>Vibrio splendidus</i> (biotipo I)	2	5,5	6	8,8
<i>V. splendidus</i> (biotipo II)			2	2,9
<i>Vibrio pelagius</i> (biotipo I)			8	11,8
<i>V. pelagius</i> (biotipo II)			2	2,9
<i>Vibrio natriegens</i>			2	2,9
<i>Vibrio. spp</i>			4	5,9
<i>Aeromona salmonicida</i>	3	8,3		
<i>Aeromonas</i> spp			4	5,8
<i>Pseudomonas</i> spp			10	14,7
<i>Moraxella-Acinetobacter</i>	1	2,8	2	2,9
Total cepas	36		68	

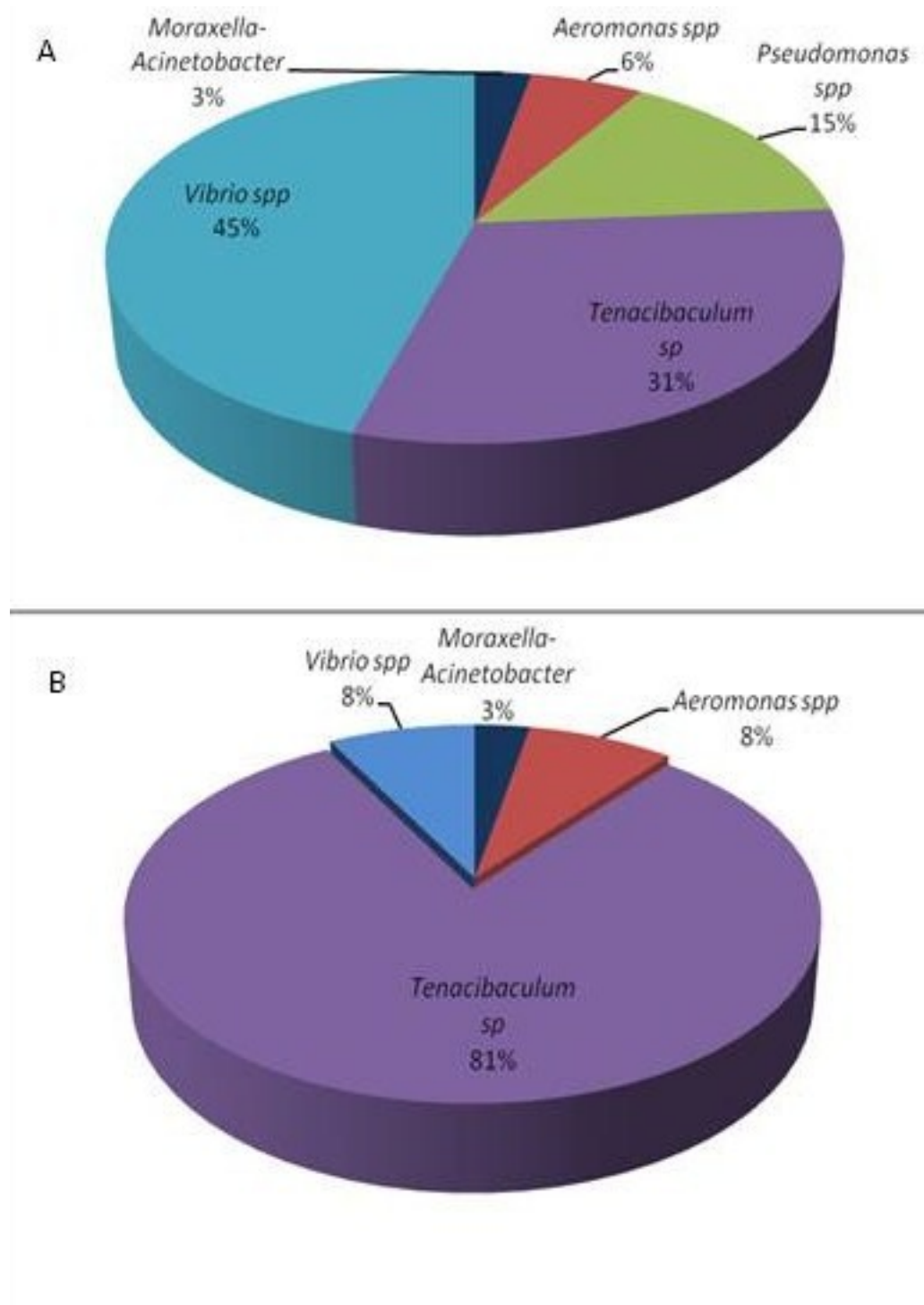


Figura 10.-Principales grupos bacterianos aislados a partir de lenguados (A) y rodaballos (B) enfermos durante los periodos 2004-06 y 2002-05, respectivamente.

Tabla 3.- Principales especies bacterianas aisladas a partir de lenguados enfermos cultivados en tres plantas de cultivo del área gallega.

Periodo	Planta	Especie (nº de casos)
2004 Septiembre	Planta 1	<i>T. maritimum</i> (1) <i>V. alginolyticus</i> (1)
Noviembre y Diciembre	Planta 1	<i>T. maritimum</i> (1) <i>Tenacibaculum</i> spp.(2) <i>Pseudomonas</i> spp (2)
2005 Mayo a Julio	Planta 1	<i>T. maritimum</i> (4) <i>Pseudomonas</i> spp (1)
Mayo a Septiembre	Planta2	<i>T. maritimum</i> (3) <i>V. alginolyticus</i> (2) <i>V. harveyi</i> (1) <i>V. splendidus</i> biotipo I(1) y biotipo II (1) <i>Vibrio</i> spp (3) <i>V. pelagius</i> biotipol (5) <i>Pseudomonas</i> spp (1)
Enero y Diciembre	Planta 1	<i>V. pelagius</i> biotipol (1) <i>Pseudomonas</i> spp(1) <i>Moraxella-Acinetobacter</i> (2)
Enero, Octubre a Diciembre	Planta 2	<i>T. maritimum</i> (4) <i>Tenacibaculum</i> spp.(1) <i>V. harveyi</i> (1) <i>V.splendidus</i> biotipo I (1) <i>Pseudomonas</i> spp (1)
2006 Mayo	Planta 2	<i>V. alginolyticus</i> (1) <i>V. splendidus</i> biotipo I (1) <i>V. natriengens</i> (1) <i>V. pelagius</i> biotipo I (1) <i>Pseudomonas</i> spp (1)
Enero	Planta 1	<i>T. maritimum</i> (1) <i>V. pelagius</i> biotipo II (1)
Enero a Abril	Planta 2	<i>T. maritimum</i> (3) <i>V. alginolyticus</i> (1) <i>Vibrio splendidus</i> biotipol(3) y biotipo II(1) <i>V. natriegens</i> (1) <i>Vibrio</i> spp. (1) <i>V. pelagius</i> biotipo II (1) <i>Pseudomonas</i> spp. (3)
Enero	Planta 3	<i>T. maritimum</i> (1) <i>V. pelagius</i> biotipo I (1)

Tabla 4.- Principales especies bacterianas aisladas a partir de 5 plantas de cultivo de rodaballo en Galicia.

Periodo	Planta	Especie (nº casos)
2002	Planta 1	<i>T. maritimum</i> (1)
Junio a Agosto	Planta 2	<i>T. maritimum</i> (2)
	Planta 3	<i>V. harveyi</i> (1) <i>Vibrio splendidus</i> (1) <i>T. maritimum</i> (1)
Abril, Octubre a Diciembre	Planta 1	<i>T.maritimum</i> (2)
	Planta 2	<i>T.maritimum</i> (3)
	Planta 3	<i>T.maritimum</i> (3) <i>Moraxella</i> spp (1) <i>V. splendidus</i> (1)
	Planta 4	<i>T.maritimum</i> (1)
2003	Planta 1	<i>T.maritimum</i> (4)
Mayo, Junio y Agosto	Planta 2	<i>T.maritimum</i> (1)
	Planta 3	<i>T.maritimum</i> (2)
	Planta 4	<i>Tenacibaculum</i> spp.
	Planta 2	<i>T. maritimum</i> (1)
Diciembre	Planta 3	<i>T. maritimum</i> (1)
2004	Planta 1	<i>T. maritimum</i> (1)
Junio		
Abril	Planta 3	<i>T. maritimum</i> (1)
2005	Planta1	<i>T. maritimum</i> (1)
Junio a Agosto	Planta 2	<i>T. maritimum</i> (1)
	Planta 4	<i>T. maritimum</i> (1) <i>T.maritimum</i> (1)
Diciembre	Planta 4	<i>A. salmonicida</i> (1)
2006		
Diciembre	Planta 5	<i>T.maritimum</i> (1)
2007	Planta 5	<i>A. salmonicida</i> (2)
Enero y Marzo		<i>T.maritimum</i> (1)

3.2.2.- Caracterización serológica

Los resultados de los ensayos de aglutinación en portaobjetos se muestran en las Tablas 11 y 12.

De 36 cepas aisladas de lenguado en el área gallega, 16 (44%) pudieron ser identificados serológicamente con alguno de los sueros empleados (Tabla 11). El 61% de las cepas de *T. maritimum* aisladas fueron tipables y reaccionaron positivamente con los sueros anti-NCIMB2153 y anti-LL01 8.3.8 (7 aislados) o con el suero anti-LPV1.7 (4 aislados) siendo incluidos en los serotipos O1 y O2, respectivamente. Las restantes cepas de esta especie no reaccionaron con ninguno de los sueros probados (sueros anti-serotipos O1, O2, O3 y O4) (4 aislados) o eran autoaglutinantes (AA) y no pudieron ser identificadas mediante este método serológico. Los aislados de *V. pelagius* y *Vibrio splendidus* fueron incluidos en los serogrupos C (2 cepas) y F (3 cepas), respectivamente.

Las cepas aisladas en otras zonas de la costa española fueron identificadas serológicamente como *Vibrio anguillarum* (serotipo O2) y *P. damsela* subsp. *piscicida*.

En el caso de las cepas aisladas de rodaballo (Tabla 12) un 73% de las cepas pudieron ser identificadas serológicamente. El 71,4 % de las cepas de *T. maritimum* aisladas fueron serotipadas y reaccionaron positivamente con alguno de los sueros probados (sueros anti-serotipos O1, O2, O3, y O4).

Un aislado de *Vibrio splendidus* fue incluido en el serogrupo F.

Las tres cepas de *A. salmonicida* reaccionaron positivamente con los antisueros anti-*A. salmonicida* subsp. *salmonicida* (anti-TO96 7.1 e IAs06.1).

Tabla 5 .- Resultados del ensayo serológico de aglutinación en portaobjetos en aislados de lenguado

Especies bacterianas	Reacción con antisuero (serogrupo)	Nº de cepas positivas/ Nº de cepas probadas
Aisladas en Galicia		
<i>T. maritimum</i>	+ (O1)	7/18
	+ (O2)	4/18
	AA	3/18
	- (NT)	4/18
<i>V. splendidus</i> I	+ (F)	1/6
<i>V. pelagius</i> I	+ (C)	1/8
	+ (F)	1/8
<i>V. pelagius</i> II	+ (C)	1/4
	+ (F)	¼
Aisladas en otras áreas		
<i>V. anguillarum</i>	+ (O2)	2/2
<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	+	1/1

“+”, reacción positiva; “-”, reacción negativa; “AA”, cepa autoaglutinante, “NT”, No tipable con los sueros usados en el estudio.

Tabla 6.- Resultados del ensayo serológico de aglutinación en portaobjetos en aislados de rodaballo

Especies bacterianas	Reacción con antisuero (serogrupo)	Nº de cepas positivas/ Nº de cepas probadas
Aisladas en Galicia		
<i>T. maritimum</i>	+ (O1)	8/28
	+ (O3)	11/28
	+ (O4)	1/28
	AA	3/28
	- (NT)	5/28
<i>V. splendidus</i> I	+ (F)	1/2
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	+	3/3
“+”, reacción positiva; “-”, reacción negativa; “AA”, cepa autoaglutinante, “NT”, No tipable con los sueros usados en el estudio.		

3.2.3.- Caracterización molecular

La identificación microbiológica de los aislados se confirmó mediante métodos moleculares basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa siguiendo la metodología descrita previamente para *T. maritimum* (Cepeda y col, 2003), *V. anguillarum* (González y col., 2004) y *P. damsela* subsp. *piscicida* (Osorio y col, 1999).

La Figura 11A, muestra los resultados obtenidos con algunas de las cepas del género *Tenacibaculum*.

La reacción de amplificación utilizando el DNA de las 48 cepas identificadas por métodos microbiológicos convencionales como *T. maritimum* y los cebadores Mar1 y Mar2 descritos por Bader y Shotss, (1998) dio como resultado un producto de PCR de la masa molecular esperada (400 pares de base). En cambio, no se obtuvo producto de amplificación con el DNA de las cuatro cepas identificadas como *Tenacibaculum* spp.

El análisis de los productos de PCR obtenidos empleando los cebadores Car1 y Car2 y el DNA de la cepa identificada fenotípica y serológicamente como *P. damsela* subsp. *piscicida* permitió confirmar su posición taxonómica, al observarse un fragmento del tamaño molecular esperado (267 pb) (Figura 11B).

El análisis de los productos de amplificación obtenidos con los cebadores rpoN-ang3 y rpoN-ang5 y el DNA de los dos aislados de *V. anguillarum* serotipo O2 también permitió confirmar la identificación al observarse una única banda de 519 pb (Figura 11C).

3.2.4.- Ensayos de patogenicidad

Los resultados de los ensayos de patogenicidad (Tablas 13, 14 y 15) demostraron que las cepas de *T. maritimum*, *V. pelagius*, *V. splendidus* y *A. salmonicida* son virulentas para lenguado cuando se utilizan dosis comprendidas entre 10^4 y 10^8 UFC/ml administradas mediante inyección intramuscular (Tablas 13 y 14). En contraste, las cepas de *V. alginolyticus* no produjeron mortalidad de los peces inoculados aún utilizando dosis muy elevadas ($9,9 \times 10^9$ UFC/ml) (Tabla 14). Las cepas de *V. anguillarum* y *P. damsela* subsp. *piscicida* mostraron un elevado grado de virulencia, produciendo la muerte de todos los peces inoculados cuando se utilizaban dosis infectivas de 10^3 - 10^4 UFC/ml (Tabla 14).

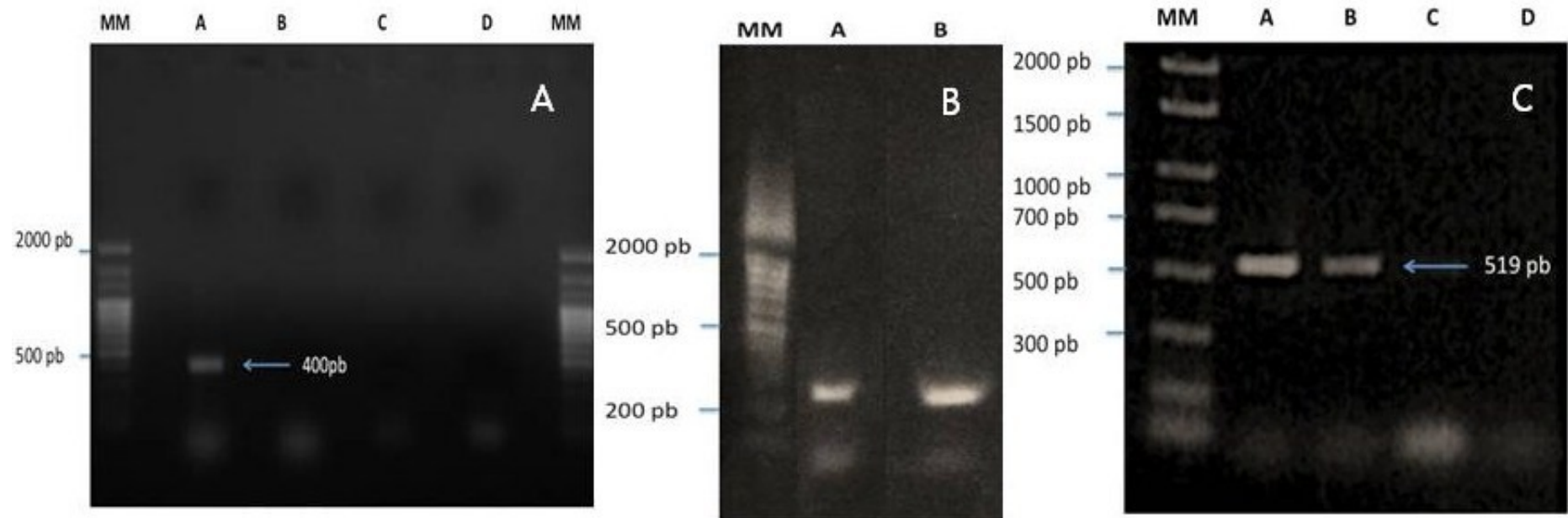


Figura 11- Productos de amplificación obtenidos con los cultivos puros de *T. maritimum* (a) , *P. damselae* subespecie *piscicida* (b) y *V. anguillarum* (c)

Tabla 7.- Infecciones experimentales en lenguado (5 gr) con cepas de *T. maritimum* inoculadas mediante inyección intramuscular

Cepa	Dosis UFC/m	Nº de peces	% Mortalidad
<i>T. maritimum</i> LL01.8.3.8	5x 10 ⁸	6	100
	5x 10 ⁷	6	100
<i>T. maritimum</i> LL05.6.2.2	6x 10 ⁸	6	100
<i>T. maritimum</i> LL05.7.1.1	5x 10 ⁸	6	83,3
<i>T. maritimum</i> SK29/04	3x 10 ⁸	6	83,3

Tabla 8.-Infecciones experimentales en lenguado (5 gr) con cepas de *Vibrio*, *Aeromonas* y *Photobacterium*.

Cepa	Dosis UFC/ml	Nº de peces	% Mortalidad
<i>V. anguillarum</i> SK33/05	4,5 x 10 ⁸	6	100
	4,5 x 10 ⁶	6	100
	4,5 x 10 ⁴	6	100
<i>V. anguillarum</i> SK197/05	1 x 10 ⁶	6	100
	1 x 10 ⁴	6	100
<i>V. splendidus</i> LM02 7.5.2	5 x 10 ⁸	6	16,6
<i>V. splendidus</i> LM02 9.1.2	1x 10 ⁹	6	16,6
	1x 10 ⁸	6	0
<i>V. pelagius</i> LL04.9.2.4	1x 10 ⁹	6	50
	1x 10 ⁷	6	0
<i>V. alginolyticus</i> LL04 9.2.3	9,0 x 10 ⁹	6	0
<i>V. alginolyticus</i> LM05 5.1.1	1 x 10 ⁹	6	0
	1 x 10 ⁸	6	0
<i>A. salmonicida</i> TO96 7.1	6 x 10 ⁶	6	66,6
<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> 486/04	6 x 10 ⁷	6	100
	6 x 10 ⁵	6	100

Los resultados de los ensayos de patogenicidad demostraron que la cepa de *T. maritimum* es virulenta para lenguado cuando se utilizan dosis de 10^7 - 10^9 UFC/ml por inyección o baño (Tabla 15), si bien las mortalidades en el caso de los inoculados por baño se retrasaron en el tiempo. Las mortalidades en los peces inoculados por inyección se iniciaron a los siete días de la inoculación y finalizaron a los trece días para las dosis más altas (10^8 - 10^9 UFC/ml) y entre los días 14 y 16 días para la dosis más baja (10^7 UFC/ml). Las mortalidades en los peces inoculados por baño se iniciaron a los dieciséis días de la inoculación y finalizaron a los veinte días. Sólo cuando la infección se realizó por inyección se recuperó la cepa inoculada a partir de riñón.

Así mismo, en el caso del rodaballo (Tablas 16 y 17) se demostró que tanto *T. maritimum* como *A. salmonicida* son virulentas para peces de 30g cuando se utilizan dosis del orden de 10^8 UFC/ml. En el caso de *A. salmonicida*, que puede causar furunculosis en el rodaballo a lo largo de todo el ciclo de producción, se probó además la virulencia en peces de 250 y 500g. Los resultados de estos ensayos (Tabla 17) indican que los peces de 250 g y 500 g son susceptibles a *A. salmonicida*, observándose mortalidades que pueden alcanzar entre el 50% y el 80% de la población de peces infectada cuando se emplean dosis del orden de 10^9 y 10^{10} UFC/ml, respectivamente. En todos los casos se recuperó la cepa inoculada a partir de riñón.

Tabla 9.- Resultados de las Infecciones experimentales de lenguado de 15 gramos de peso medio.

Cepa	Dosis UFC/ml	Nº peces muertos/ Nº de peces inoculados	% Mortalidad
<i>T. maritimum</i> LL01.8.3.8/ inm	9×10^8	8/8	100
	9×10^7	8/8	100
	9×10^6	8/8	100
<i>T. maritimum</i> LL01.8.3.8/ i. sc	9×10^8	8/8	100
	9×10^7	8/8	100
	9×10^6	8/8	100
<i>T. maritimum</i> LL01.8.3.8/ i.m	9×10^8	8/8	100

Tabla 10.- Infecciones experimentales en rodaballo (30 g) con cepas de *T. maritimum* y *A. salmonicida* subsp *salmonicida*.

Cepa	Dosis UFC/ml	Nº peces muertos/ Nº de peces inoculados	% Mortalidad
<i>T. maritimum</i> LPV 1.7	2×10^{10}	50/50	100
	2×10^9	45/50	90
	2×10^8	43/50	85
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> TO 96 7.1	3×10^{10}	50/50	100
	3×10^9	47/50	95
	3×10^8	50	90

Tabla 11.- Infecciones experimentales en rodaballo (250-500 g) con cepas de *A. salmonicida* subsp *salmonicida*.

Cepa	Dosis UFC/ml	Nº peces muertos/ Nº de peces inoculados	% Mortalidad
<i>T. maritimum</i>	2x10 ⁸	25/50	50
LPV 1.7	2x 10 ⁶	6/50	12
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	2x10 ⁹	40/50	80
TO 96 7.1	2x10 ⁷	10/50	20

3.3.- Discusión

El desarrollo y establecimiento de métodos eficaces de prevención y control de enfermedades infecciosas en acuicultura requiere la identificación de los agentes etiológicos que afecten a los peces cultivados en las plantas de cultivo de la región geográfica donde se pretendan instaurar dichas medidas. Por ello, el primer objetivo del presente estudio fue la realización de muestreos en diferentes piscifactorías de Galicia con el fin de realizar el aislamiento y la caracterización fenotípica, serológica y molecular de bacterias causantes de enfermedades en lenguados y rodaballos.

Las especies bacterianas aisladas con mayor frecuencia a partir de rodaballo y lenguado en piscifactorías de Galicia durante el período en estudio (2002-2007) fueron *Tenacibaculum maritimum* sólo o en combinación con diferentes especies del género *Vibrio* (*Vibrio alginolyticus*, *V. pelagius*, *V. splendidus* y *V. harveyi*) y *A. salmonicida*, solo detectada en alguna de las instalaciones dedicadas al cultivo de rodaballo. A partir de lenguado cultivado en otras áreas de la península Ibérica se aislaron además *V. anguillarum* y *P. damsela* subsp. *piscicida* asociados a importantes mortalidades en lenguado. La identificación microbiológica de los aislados se confirmó mediante métodos moleculares basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Los géneros *Vibrio*, *Photobacterium* y *Tenacibaculum* han sido descritos como la principal causa de mortalidades en diferentes especies de peces marinos cultivados, siendo *V. anguillarum* y otras especies del género *Vibrio* (*V. splendidus*, *V. pelagius* y *V. harveyi*), *P. damsela* subsp. *piscicida* y *T. maritimum* las principales especies responsables de las mortalidades asociadas a vibriosis, fotobacteriosis y tenacibaculosis en los cultivos de rodaballo y lenguado, así como de otras especies de importancia económica como la lubina y dorada, a nivel mundial (Toranzo y col., 2005; Buller, 2014, Austin y Austin, 2016).

Con respecto a los estudios serológicos, los resultados pusieron de manifiesto que los principales serotipos de *T. maritimum* aislados como causantes de tenacibaculosis en lenguado fueron el O1 (38,8%) y el O2 (22%), mientras que los serotipos O1 (28,5%) y O3 (39,2%) fueron los principales causantes de mortalidades en rodaballo. Estudios previos han demostrado la existencia de variabilidad serológica dentro de la especie *T. maritimum* (Pazos, 1997; Santos y col., 1999; Santos, 2005, Avendaño y col., 2004; Avendaño y col., 2005) y el predominio del serotipo O1 como agente causal de tenacibaculosis (Fernández-Álvarez y col., 2018). Con respecto a los aislados del género *Vibrio*, el serotipo O2 de *V. anguillarum*, descrito como el principal agente causal de vibriosis en bacalao y otros peces marinos (Myhr y col 1991, Larsen y col, 1994), sólo fue detectado en las muestras de lenguados co-cultivados

con dorada o lubina en el área Mediterránea. El serotipo F, detectado entre las cepas *V. splendidus* aisladas a partir de lenguado y rodaballo en el presente estudio, ha sido descrito previamente en cepas aisladas de peces marinos (rodaballo y bacalao) cultivados en España y Dinamarca (Santos y col., 1996, 1997).

El uso de buenas prácticas de manejo, una nutrición adecuada y el establecimiento de medidas profilácticas basadas en la vacunación son esenciales para prevenir el desarrollo de la vibriosis y otras enfermedades infecciosas de etiología bacteriana y viral (Gudding y col., 2014). De hecho, la no detección de casos de vibriosis asociados a *V. anguillarum* en ninguna de las especies de peces objeto de estudio en las piscifactorías de Galicia, podría ser debido a que la vacunación frente a estas especies bacterianas en los estadios iniciales del cultivo de rodaballo y lenguado es una práctica rutinaria en las piscifactorías de nuestra Comunidad autónoma. Así mismo, la no detección de tenacibaculosis en rodaballo asociadas al serotipo O2 de *T. maritimum* podría explicarse por la aplicación sistemática de una vacuna frente a este serotipo en las granjas de cultivo del rodaballo. En contraste, la detección en lenguados enfermos, procedentes de otras áreas de la península ibérica, de *V. anguillarum* y *P. damsela* subsp. *piscicida* puede deberse al co-cultivo del lenguado con otras especies de peces susceptibles a la vibriosis y a la fotobacteriosis como la dorada y la lubina que pueden transmitir de forma horizontal estos microorganismos.

Otro hecho observado en este trabajo es el aumento en el número de episodios de mortalidad relacionado con el incremento de las temperaturas. La existencia de relación entre el incremento de la temperatura y el número de episodios de mortalidad ha sido descrita previamente en dentón común (*Dentex dentex*) (Company y col., 1999) y lenguado senegalés (Arijo y col., 2005) cultivados en el Mediterráneo y podría atribuirse a que el aumento de la temperatura produce estrés en los peces, comprometiendo su sistema inmune y su resistencia a potenciales patógenos (Rottmann, 1992; Kollner B, 2002).

Con el fin de valorar el riesgo potencial para los cultivos de rodaballo y lenguado de las especies bacterianas aisladas con mayor frecuencia durante el presente estudio, se realizaron infecciones experimentales utilizando ambas especies de peces como modelo experimental y cepas representativas de *T. maritimum*, *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, *P. damsela* subsp. *piscicida*, *V. anguillarum*, *V. splendidus*, *V. pelagius* y *V. alginolyticus*.

Los resultados obtenidos indican que, excepto *V. alginolyticus*, todas las cepas de las especies analizadas eran virulentas y producían mortalidad al ser inoculadas por vía intramuscular en juveniles de rodaballo y lenguado, confirmando su potencial patógeno para ambas especies de peces. En el caso de *A. salmonicida*, también se ha demostrado su capacidad para causar furunculosis en rodaballos de mayor tamaño (250 y 500g).

Estos resultados concuerdan con las observaciones de campo que indican que el lenguado y el rodaballo son especies susceptibles a la vibriosis, tenacibaculosis, fotobacteriosis y furunculosis.

Debido a que existen referencias contradictorias con respecto a cuál es la ruta idónea para evaluar el grado de virulencia de cepas de *T. maritimum* y para reproducir los signos característicos de la tenacibaculosis, en el presente estudio se realizaron infecciones experimentales utilizando una cepa del serotipo O1 de esta especie bacteriana y, como vías de administración de la bacteria, la inyección intramuscular, la inyección subcutánea en el seno dorsal medio y el baño. Los resultados obtenidos demostraron que la cepa de *T. maritimum* es virulenta para lenguado cuando se utilizan las vías de inyección (subcutánea o intramuscular) o baño. Las principales diferencias detectadas en base a la vía utilizada para administrar la bacteria fueron el tiempo transcurrido desde la infección hasta el inicio de las mortalidades (7 días en peces infectados por inyección y 16 días en peces infectados por baño) y que sólo

cuando la infección se realizó por inyección se recuperó la cepa inoculada a partir de riñón. Además, los estudios realizados por nuestro grupo de investigación en colaboración con el grupo de anatomía patológica dirigido por la Dra. M^a Isabel Quiroga Berdeal han permitido demostrar que la infección mediante inyección subcutánea permite reproducir algunos de los signos clínicos de la tenacibaculosis descritos en infecciones naturales en rodaballo (Failde y col, 2013) y lenguado (Failde y col., 2014). Estos resultados contrastan con los descritos por Avendaño y col (2006) quienes encontraron que el baño prolongado (18 h) es la única ruta eficaz de infección en rodaballo.



4. OPTIMIZACIÓN DE TÉCNICAS DE ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE NO ESPECÍFICA

4.1.- Materiales y métodos

4.1.1.- Peces utilizados y condiciones de mantenimiento

Para la realización de los estudios se utilizaron ejemplares sanos de rodaballo y lenguado provenientes de acuicultura. El centro y proyecto de experimentación autorizados, persona responsable de la realización de los ensayos, normativa vigente en la materia, así como las condiciones experimentales y de mantenimiento de los peces fueron las descritas en el apartado 3.1.3 de esta memoria.

Para la obtención de muestras de suero, los peces se anestesiaron con MS222 (100 mg/L). Para la obtención de órganos internos los peces se sacrificaron por sobredosis del anestésico (200 mg/L).

4.1.2.-Evaluación de métodos para estudiar la respuesta inmune humoral

En este estudio se han evaluado tres parámetros del sistema inmunitario humoral no específico: actividad lisozima, actividad bactericida y actividad de la vía alternativa del complemento del suero de rodaballo. Para todos los ensayos se utilizaron sueros no inmunes (peces control) y sueros inmunes frente a *T. maritimum*.

4.1.2.1- Obtención de antisueros en rodaballo

Para la obtención de antisueros los rodaballos (300g de peso medio) se inmunizaron mediante inyección intracelómica, siguiendo la metodología descrita por Hastings y Ellis (1988). Como antígeno se emplearon las células bacterianas de la cepa de *T. maritimum* LL01 8.3.8 (serotipo O1) inactivadas con 0,2% de formaldehído en PBS (FPBS-2) y ajustadas a una concentración aproximada de 10^9 UFC/ml (tubo nº3 escala McFarland). Los peces se inyectaron por vía intracelómica con 0,3 ml de una emulsión de la suspensión bacteriana con adyuvante incompleto de Freund (1:1). Transcurridos 20 días se administró una dosis de recuerdo (0,3 ml) por la misma vía.

Se utilizaron lotes de 10 peces para la inmunización con la cepa bacteriana y 10 peces control a los que se les administró FPBS-2. Al mes de administrar la segunda dosis se procedió a tomar muestras de sangre de los peces para la obtención de los antisueros. Para ello, los peces se anestesiaron (100 mg/ml de MSS-222) y se procedió a la extracción de la sangre por punción de la vena caudal. La sangre obtenida se dejó coagular durante 2 horas a temperatura ambiente y 12 horas a 4°C, a continuación, se centrifugó a 3000 rpm (10 min. a 4°C) para separar el suero de los restos sólidos. El suero se distribuyó en viales en alícuotas de 1 ml y se mantuvo a -30°C hasta su uso.

Previamente a la inmunización se procedió a la extracción de sangre de los rodaballos para la obtención de suero no inmune utilizado como control.

4.1.2.2.- Estudio de la actividad lisozima del suero

Se han evaluado dos técnicas para la determinación de la actividad lisozima: un ensayo turbidimétrico y un ensayo en placa.

Ensayo turbidimétrico: se utilizó la técnica descrita por Parry y col. (1965), modificada por Grinde y col. (1988), que emplea células de *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma) como sustrato para la lisozima. Para la realización de este ensayo se trataron las suspensiones de *Micrococcus lysodeikticus* (0,003 g/ml en tampón fosfato potásico 0,1M a pH 6,4) con el suero de peces (diluido 1/3 con el mismo tampón), y se leyó la absorbancia a 450 nm (A_{450}) en lector de microplacas (Model 550, BioRad, Hercules, Canada) a tiempo cero y a intervalos de 1 minuto hasta completar los 4 minutos. Como blanco se utilizó la suspensión bacteriana tratada con tampón de ensayo.

Una unidad de actividad lisozima se definió como la cantidad de enzima que produce una reducción en la absorbancia de 0,001/min. Los resultados se expresan en unidades enzimáticas (UE) por mililitro de suero.

Ensayo en placa: la actividad lisozima del suero de peces se determinó en placas de agarosa al 1% en tampón fosfato potásico 0,1 M, pH 6,4 que contenían células de *Micrococcus lysodeikticus* (0,5 mg/ml) como sustrato para la lisozima. Una vez solidificada la agarosa se perforaron los pocillos con ayuda de un sacabocados y se dispensaron 25 μ l del suero diluido en cada pocillo. Como blanco se utilizaron 25 μ l del tampón de ensayo.

Transcurridas 24-48 horas desde la inoculación, se midió el diámetro de la zona de lisis, manifestada por la aparición de un halo de aclaramiento. Para mejorar la visualización de las zonas de lisis se deshidrataron los geles de agarosa, se tiñeron durante 15 min en una disolución de Azul Coomassie R-250 (Sigma) al 0,05% en solución acuosa de isopropanol al 25% y ácido acético al 10% y se destiñeron utilizando la misma solución sin el colorante.

La actividad lisozima del suero se determinó por comparación con una curva estándar que fue construida utilizando concentraciones crecientes de lisozima (50 a 1000 UE/ml) (Sigma).

4.1.2.3.- Estudio de la actividad bactericida del suero

La actividad bactericida del suero se evaluó mediante un método colorimétrico, tanto en placa de microtitulación como en tubo, utilizando la cepa R-82 de *V. anguillarum* como modelo y el compuesto 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-bromuro de difeniltetrazolio (MTT), para evaluar la viabilidad celular en función del potencial redox. El MTT es reducido por las deshidrogenasas bacterianas adquiriendo un color púrpura.

Micrométodo en placa: para este estudio la cepa de *V. anguillarum* R82 se cultivó en el medio caldo de Soja Triptona suplementado con 1% de NaCl (TSB-1) durante 24 h a 25°C con agitación y el cultivo se ajustó con medio TSB-1 a una densidad de 10^8 UFC/ml. El ensayo bactericida se realizó en placas de microtitulación de fondo plano, utilizando tres réplicas por cada muestra de suero. El ensayo se realizó mezclando 20 μ l de suero y 80 μ l de la suspensión bacteriana por réplica. Tras un período de incubación de 12h a 25°C, se añadieron a cada réplica 10 μ l de 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) (5 mg/ml) disueltos en Dimetilsulfóxido (DMSO), se homogenizó la muestra con ayuda de una micropipeta y se incubó la placa en oscuridad durante 15 min a 25 °C.

La reducción del MTT se determinó por la medida de la absorbancia de las muestras a

una longitud de onda de 620 nm (A_{620}) utilizando un lector de microplacas (Model 550, BioRad, Hercules, Canada).

Como blanco se utilizó una mezcla de medio de cultivo bacteriano y de suero control y como control negativo la suspensión de bacterias tratadas con TSB-1 en lugar de suero.

Los resultados se expresaron como índice bactericida (IB) definido como:

$$IB = \frac{A_{620} \text{ de la muestra tratada con suero}}{A_{620} \text{ del control negativo}}$$

Macrométodo en tubo: se siguió el procedimiento antes descrito pero ajustando los volúmenes a 1 ml final y realizando la lectura de absorbancia (A_{620}) de las muestras en un espectrofotómetro (modelo DU^R 730, Beckman Coulter).

4.1.2.4.- Estudio de la vía alternativa del complemento

Al igual que el estudio de la actividad bactericida, la vía alternativa del complemento también se evaluó por un micrométodo en placa y un macrométodo en tubo.

Micrométodo en placa: se determinó el grado de hemólisis de eritrocitos humanos según la metodología descrita por Sitjá-Bobadilla y col. (2008). El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos con fondo en U. Para ello se mezclaron 25 μ l de una suspensión de eritrocitos humanos al 5 % preparada en solución Hanks suplementada con 10 mM de Etilenglicol-bis (2-aminoetileter)-N,N,N',N'-ácido tetracético (EGTA) y 10 mM Mg²⁺ (Sigma) con 100 μ l de las diluciones seriadas de los sueros problema. Las placas se incubaron durante 100 min a 20°C con agitación constante, se centrifugaron a 200 rpm durante 5 min y se transfirió el sobrenadante a una nueva placa para determinar la absorbancia a 415 nm (A_{415}). Como control positivo (100 % hemólisis) se utilizó la suspensión de eritrocitos (25 μ l) tratada con 100 μ l de agua destilada estéril y como control negativo (hemólisis espontánea) se usó la suspensión de eritrocitos tratada con solución de Hanks suplementada con 10 mM EGTA y 10 mM Mg²⁺ incubados en las mismas condiciones que las muestras de suero.

La actividad de la vía alternativa del complemento se expresó como el valor CH₅₀ que hace referencia a la dilución del suero que causa un 50 % de hemólisis en una suspensión de eritrocitos. Para el cálculo de este valor se utilizó la ecuación de Von Krogh.

Macrométodo en tubo: se utilizó una modificación del micrométodo en placa explicado anteriormente, para lo cual se ajustaron los volúmenes a 1 ml final y se realizó la lectura de absorbancias (A_{415}) en espectrofotómetro convencional.

4.1.3.- Optimización de técnicas de estudio de la respuesta inmune celular

Para el estudio de la respuesta inmune celular, se han evaluado cuatro parámetros del sistema inmune celular no específico: actividad fagocítica, estallido respiratorio, linfoproliferación y actividad citotóxica de los leucocitos de rodaballo y lenguado.

4.1.3.1.- Obtención de leucocitos y determinación de la viabilidad

Para este estudio se han utilizado leucocitos obtenidos a partir de sangre, riñón y bazo de rodaballo y lenguado.

Los peces se anestesiaron según lo descrito en el apartado 4.1.1 y se extrajo la sangre de forma aséptica por punción de la vena caudal utilizando una jeringuilla con heparina (Sigma). La sangre se depositó en tubos estériles heparinizados y se conservó refrigerada hasta su procesamiento. Para la obtención de los órganos internos se practicó un “corte en bolsillo”, (Figura 12) se extrajo el riñón cefálico y el bazo, que se depositaron en un tubo con medio esencial mínimo (MEM) de Eagle (Biochrom, Cambridge, UK), suplementado con 10 IU/ml de heparina (H), y antibióticos (100 IU/ml de penicilina, y 100 µg /ml de estreptomicina (Biochrom)).

Obtención de leucocitos de riñón y bazo: el tejido de riñón y bazo se disgregó forzando su paso a través de una malla de nylon de 100 µm de luz, con la ayuda de una espátula de acero estéril y con adición de medio MEM suplementado con antibiótico (MEM-0). La suspensión celular resultante se depositó en un tubo con medio de separación celular Ficoll-Paque TM PLUS (polisacárido sintético, Amersham Biosciences, Suecia) y se centrifugó (400 rpm a 4°C) durante 20 min. La interfase rica en leucocitos se recogió con una pipeta Pasteur, se lavó por centrifugación con medio MEM-0 y con el precipitado celular resultante se preparó una suspensión en medio MEM suplementado con 5% de suero fetal (MEM-5).



Figura 12- Disección del pez para la extracción de órganos

Obtención de leucocitos de sangre: para la obtención de leucocitos de sangre se valoraron dos métodos diferentes, uno basado en la lisis hipotónica y otro utilizando el método de separación celular comercial Ficoll-Paque TM PLUS.

Lisis hipotónica: se siguió básicamente el método descrito por Inoue y col. (2002). La sangre heparinizada se diluyó 1:100 en agua destilada estéril a 4°C, y se mantuvo en agitación durante 15 seg. Finalizado el tratamiento, se mezcló la suspensión de células sanguíneas con Tampón Hanks (HBSS, Biochrom) en una proporción 10:90, y se filtró con una malla de nylon de 100 µm de luz. El filtrado se lavó por centrifugación y se suspendió en medio MEM-5.

Extracción con Ficoll: la sangre recogida se depositó en un tubo con Ficoll, y se procesó según lo descrito en el apartado anterior para la obtención de leucocitos de riñón y bazo.

Determinación de células viables: la viabilidad celular se determinó mediante los métodos de exclusión con yoduro de propidio (IP) o con azul tripán (TB).

Para ello se tomó una muestra de la suspensión de leucocitos y se les adicionó TB o la

solución de IP a una concentración final de 0,02 % (v/v) y de 10 µg/ml, respectivamente. Transcurridos 3 minutos, se contaron los leucocitos viables al microscopio óptico (Nikon Eclipse 50i) en una cámara Neubauer o se examinó la muestra en el citómetro (FACScalibur (Becton Dickinson, Madrid) (canal FL2H, filtro de banda 585 nm).

4.1.3.2.- Estudio de las poblaciones celulares mediante citometría de flujo.

Para el estudio de las poblaciones de leucocitos se utilizaron suspensiones celulares ajustadas a una concentración de 1×10^6 células viables/ml mediante recuento microscópico utilizando TB.

Los parámetros del citómetro se ajustaron hasta que hubo una perfecta discriminación de las subpoblaciones presentes en las suspensiones de leucocitos de las diferentes especies de peces en estudio, atendiendo a dos parámetros, el tamaño (FSC) y la complejidad (SSC). En cada muestra se analizaron 1×10^4 células viables, utilizando yoduro de propidio (IP) (Sigma) para marcar las células muertas y excluirlas del estudio. Para el análisis de los resultados se utilizó el software libre WinMDI 2.8 (Purdue University Cytometry Laboratories, USA).

4.1.3.3.- Análisis de la capacidad fagocítica.

La actividad fagocítica se evaluó mediante citometría de flujo siguiendo básicamente la metodología de Esteban y col. (1998), empleando leucocitos de riñón de rodaballo y lenguado y células de *Tenacibaculum maritimum*.

Marcado de bacterias: las células de *T. maritimum* cepa LL01.8.3.8 se marcaron con isocianato de fluoresceína (FITC, Sigma) siguiendo el procedimiento descrito por Sigma para el marcado de proteínas. Con este fin, la bacteria *T. maritimum* se sembró en medio FMM (Pazos y col. 1996), y se cultivó a 25°C durante 48 horas. Las células bacterianas se recogieron en un tubo con PBS, se lavaron por centrifugación (12000 rpm) y el precipitado celular resultante se suspendió en tampón carbonato sódico-bicarbonato 0.1 M de NaHCO₃ (pH 9.5) a una concentración de 10^9 células/ml por comparación de su turbidez con la del Tubo 4 de la escala McFarland.

Para acoplar el isotiocianato de fluoresceína (FICT, Sigma) a las bacterias, las suspensiones preparadas en tampón carbonato se incubaron en oscuridad a 4°C durante 12 horas con 50 y 100 µg/ml de FICT [1 mg/ml en Dimetilsulfóxido (DMSO)]. Tras el marcaje las células bacterianas, se lavaron tres veces por centrifugación (12000 rpm) con PBS para eliminar el FICT libre y se suspendieron en el mismo tampón.

La uniformidad del marcaje se comprobó en el citómetro y posteriormente la suspensión de bacterias marcadas se distribuyó en tubos que se guardaron en oscuridad a 4°C y a -80°C hasta su uso para ver el efecto que tenía la temperatura de almacenamiento de las bacterias sobre el marcaje de las mismas.

Ensayo de fagocitosis: en este estudio se evaluaron mezclas de bacterias:leucocitos a diferente ratio (100:1, 50:1). El ensayo se realizó añadiendo 10 µl de la suspensión de bacterias marcadas con FICT a 100 µl de una suspensión de leucocitos que contenía 1×10^6 células/ml y se incubó la mezcla a 16°C (leucocitos rodaballo) y a 18°C (leucocitos de lenguado) durante 30 minutos. Tras el período de incubación, los tubos se introdujeron en hielo y se les añadió 500 µl de PBS frío para detener la fagocitosis. Como control negativo se utilizó un tubo con leucocitos al que no se le adicionaron bacterias.

Para eliminar la fluorescencia extracelular producida por las bacterias marcadas y no

ingeridas se utilizaron dos métodos:

1) Lavado por centrifugación (Chilmonzyk y Monge, 1999): las bacterias no ingeridas se separaron de los fagocitos mediante tres lavados por centrifugación (1000 rpm, a 4°C durante 10 min) con PBS frío. El sedimento celular se suspendió en 500µl de MEM-5 frío.

2) Apagado con Azul tripán (TB) (Esteban y col., 1998): la fluorescencia de las bacterias no ingeridas se apagó por adición de 10µl de TB frío (el rango de concentraciones de TB utilizadas fue de 0.2 a 2%).

Como control negativo, se utilizaron leucocitos incubados durante 0 min con bacterias marcadas, antes del lavado por centrifugación o antes de la adición de TB para el apagado.

Tras estos tratamientos, las muestras se homogenizaron mediante agitación suave, se añadió IP con el fin de excluir las células muertas y se realizó el análisis por citometría de flujo, determinando la distribución de fluorescencia verde (canal FL1H, filtro de banda 530 nm) en la subpoblación de células fagocíticas. La actividad fagocítica se definió como el porcentaje de fagocitos que poseían en su interior una o más bacterias ingeridas (células con fluorescencia verde), con respecto a la población total analizada (10.000 células).

4.1.3.4. Estallido respiratorio y efecto sobre la supervivencia bacteriana

El estallido respiratorio se cuantificó mediante citometría de flujo, empleando como sonda una disolución 10mM de dihidrorodamina 123 [123-DHR, (Sigma)] en DMSO, según la metodología descrita por Smith y Weidemann (1993). La 123- DHR es una molécula no fluorescente, que al reaccionar con los compuestos reactivos del oxígeno y/o del nitrógeno producido durante el estallido respiratorio, se oxida intracelularmente dando un compuesto fluorescente (DHR-123).

Para la realización de este ensayo, se utilizaron tubos con 1 ml de una suspensión que contenía 1×10^6 células/ml leucocitos de sangre, riñón, o bazo preparada en medio MEM-5 y se incubaron en oscuridad a 16°C (células de rodaballo) y a 18°C (células de lenguado) con 50 µl de un activador soluble, Acetato de Forbol Miristato (PMA, 0,2µg/ml, concentración final) (Sigma). Con el fin de determinar el tiempo óptimo de incubación con PMA para inducir el estallido respiratorio, se realizó una primera medida antes de la adición del estimulante y medidas a intervalos regulares (10, 20, 30, 45 y 60 minutos) después de la adición del PMA. Como control negativo se utilizaron leucocitos a los que se les añadieron 50µl de MEM-5 (células no estimuladas) mantenidos en las mismas condiciones que los leucocitos estimulados.

Finalizada la incubación, se añadieron a todos los tubos 50µl de 123-DHR (50 µM de concentración final), se incubaron las células en oscuridad durante 30 minutos y se determinó la media geométrica de la intensidad de fluorescencia (GMFI) intracelular de las células no estimuladas y de las estimuladas con PMA en el citómetro de flujo (canal FL1H, filtro de banda de 530 nm). Los resultados se expresaron mediante el índice de estimulación (IE), calculado según la siguiente fórmula:

$$IE = \frac{\text{GMFI de leucocitos estimulados}}{\text{GMFI de leucocitos no estimulados}}$$

El valor se expresa como la media \pm Error Estándar (EE). Para cada muestra se analizaron en total 10.000 células.

Asimismo, como parte de este estudio se determinó el efecto de la incubación con células bacterianas (activador no soluble) sobre la actividad estallido respiratorio. Para ello, se repitieron los ensayos inoculando los leucocitos de riñón anterior de rodaballo y lenguado con

los siguientes estimulantes: i) suspensión bacteriana de la cepa LL01 8.38 (100 µl) ajustada a una concentración de 1×10^9 UFC/ml, ii) PMA y iii) una mezcla de PMA+bacterias. Para determinar el tiempo óptimo de incubación para inducir el estallido respiratorio, se realizaron medidas de la actividad a intervalos de 45 min, 6 y 24 h después de la adición de los estimulantes (PMA, bacterias o PMA+bacterias).

Con el fin de evaluar el efecto del estallido respiratorio sobre la viabilidad de *T. maritimum*, se determinó el número de unidades formadoras de colonia (UFC) mediante recuento en placa. Para ello se tomó una muestra de 100 µL de la suspensión de leucocitos de riñón incubados con la suspensión de células de *T. maritimum* o con las células bacterianas y PMA, se lavaron las muestras por centrifugación, se lisaron los leucocitos mediante adición de agua destilada fría estéril, la suspensión resultante se lavó por centrifugación, se suspendió en solución salina y se realizaron diluciones decimales seriadas que se sembraron en placas de agar FMM. Las placas se incubaron durante 72h a 25°C y se procedió al recuento bacteriano.

4.1.3.5.- Actividad citotóxica

Se utilizó una modificación de la técnica descrita por Chilmonczyk y Monge (1999). Las células diana utilizadas en el ensayo fueron la línea CCL-214 (linfoma humano) y EPC (Epitelioma papuloso de carpa) suministradas por la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). El ensayo se basó en el análisis simultáneo de dos señales fluorescentes que permitieron la diferenciación de las células efectoras no fluorescentes con respecto a las células diana viables, que muestran fluorescencia verde, y las células diana muertas, que muestran además fluorescencia roja.

El marcaje de las células diana se realizó incubando las células CCL-214 o EPC durante 45 min con una solución 3 mM de 3,3'-Perclorato de Dioctadecilcarbocianina (DIO) (Sigma), un fluorocromo con fluorescencia verde que se liga a los lípidos de la membrana celular. Finalizada la incubación las células se lavaron por centrifugación para eliminar el DIO libre y se suspendieron en MEM-10 para su uso (medio MEM suplementado con 10% de suero fetal).

El ensayo se realizó mezclando los leucocitos con las células diana e incubando a 16°C (leucocitos de rodaballo) y a 18°C (leucocito de lenguado) durante 2 horas en presencia de IP (10 µg/ml), que sólo tiñe el ADN de las células muertas emitiendo fluorescencia roja. Con el fin de optimizar la técnica se evaluaron mezclas de leucocitos:células diana a diferente ratio (100:1, 50:1 y 20:1). Como control se utilizaron las células diana incubadas en presencia de IP durante el mismo período de tiempo. Finalizado el período de incubación se realizó el análisis de las suspensiones celulares mediante citometría de flujo en el canal (FL2H con un filtro de 585 nm para IP y FL1H con un filtro de 530 nm para DIO), determinando el porcentaje de células diana viables en los tubos control y en los tubos incubados con leucocitos. Para cada muestra se analizaron un total de 10000 células. La actividad citotóxica, un parámetro que describe el porcentaje de células diana no viables, se calculó mediante la fórmula:

$$\text{Actividad citotóxica} = 100 \times \frac{(\% \text{ mortalidad muestra} - \% \text{ mortalidad control})}{(100 - \% \text{ mortalidad control})}$$

Donde:

- Muestra: mezcla de células diana y efectoras
- Control: células diana

4.1.3.6.- Proliferación de leucocitos

La proliferación de leucocitos se valoró por citometría de flujo, empleando un método que utiliza el agente intercalante IP para cuantificar las variaciones en el contenido de ADN durante el ciclo celular (G0, fase de reposo; G1, fase de pre-síntesis; S, fase de síntesis; G2, fase de post-síntesis; M, mitosis) (Figura 13). Para el estudio de la proliferación de leucocitos se utilizó la metodología descrita por Chilmonczyk y Monge (1999) con algunas modificaciones. Para estimular la proliferación de leucocitos de rodaballo y lenguado se valoraron los siguientes compuestos: lipopolisacáridos (LPS) purificados de *Escherichia coli*, (Sigma), PMA y Concanavalina A (Con A) (Sigma) y la bacteria *T. maritimum*.

Para el estudio de proliferación leucocitaria, las suspensiones de leucocitos, ajustadas a una concentración de 2×10^6 células/ml, se incubaron en medio MEM-10 suplementado con LPS (200 µg/ml), PMA (10 µg/ml), ConA (50 µg/ml) y la cepa LL01.8.3.8 de *T. maritimum* (10^9 UFC/ml) o sin suplementar (tubos control), durante 48 horas a 9°C (leucocitos de rodaballo y lenguado), y además otra réplica de tubos se incubaron a la temperatura óptima de cada una de las dos especies de peces utilizadas en el estudio. Finalizado el período de incubación, las suspensiones de leucocitos se centrifugaron, el precipitado celular resultante se fijó con etanol al 70% y se conservó a -20°C hasta su análisis por citometría de flujo (canal FL2H, filtro de 585 nm).

Para el análisis, las células fijadas se lavaron previamente por centrifugación (1960 rpm/15 min), se suspendieron en PBS y se trataron primero a 37°C durante 30 minutos con una solución de RNAasa (Sigma) (concentración final de 0,5mg/ml) y, a continuación, durante 30 minutos en oscuridad, con una solución de IP (concentración final de 10µg/ml) antes de proceder a la lectura en el citómetro. Para cada muestra se analizaron un total de 10000 células.

El porcentaje de células en cada fase del ciclo celular (G0/G1, S, o G2/M) se determinó utilizando el software libre para análisis del ciclo celular Cylchred (versión 1.0.2 para Windows 95, Universidad de Cardiff, UK).

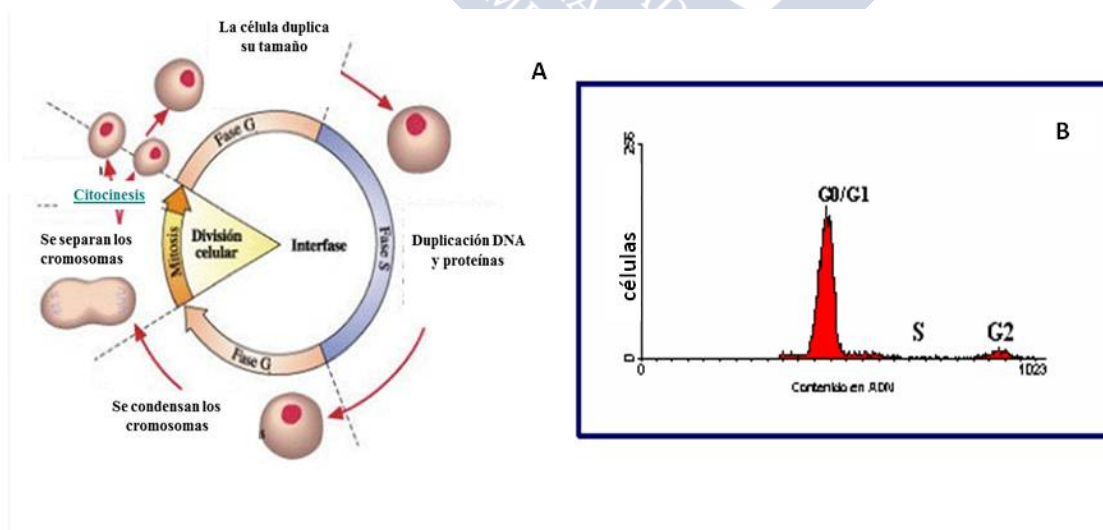


Figura 13.- Ciclo celular (A) y contenido de ADN celular durante las fases G0/G1, S y G2 (B).

4.1.3.7.- Estudio de la apoptosis de leucocitos

La actividad de las cisteinil- aspartato proteasas 3 y 7 (caspasas efectoras), la disrupción del potencial de membrana mitocondria y la fragmentación del ADN genómico se evaluaron como indicadores de la apoptosis/necrosis de los linfocitos de rodaballo tras la incubación con bacterias patógenas, PMA o una mezcla de ambos.

Se utilizaron 10 rodaballos de entre 80 ± 10 g a los que se les extrajo el riñón anterior para la obtención de leucocitos según la metodología descrita en el apartado 4.1.3.1.

A) Tratamiento de los linfocitos: las suspensiones de leucocitos de riñón (10^6 células/ml) se incubaron a 16°C durante 45 minutos con una suspensión de la cepa LL01.8.3.8 *T. maritimum* preparada en PBS (10^9 UFC/ml) a una ratio bacterias:leucocitos de 100:1, o con 50 μl de PMA, o con 50 μl de la suspensión de bacterias y 50 μL de PMA. Como control se utilizaron suspensiones de leucocitos incubados en las mismas condiciones con 50 μL de PBS. Posteriormente, se procedió al análisis de la pérdida de potencial de membrana mitocondrial, la actividad de las caspasas y la fragmentación del ADN.

B) Disipación del potencial de membrana mitocondrial

La detección de cambios en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$) mediante citometría de flujo es un método útil para la detección de los estadios apoptóticos iniciales.

La pérdida de potencial de la membrana mitocondrial en los leucocitos sometidos a los tratamientos descritos en el apartado 4.1.3.7 A, se determinó mediante citometría de flujo (FL1H, filtro de 530 nm) tras la adición de 123-DHR (50 μM de concentración final), un colorante fluorescente catiónico que es absorbido fácilmente por las células vivas, acumulándose en las mitocondrias energizadas. El grado de captación de la sonda, medido como la intensidad de fluorescencia celular, es proporcional al potencial de la membrana mitocondrial.

C) Determinación de la actividad caspasa: la actividad caspasa en los leucocitos sometidos a los tratamientos descritos en el apartado 4.1.3.7 A, se determinó utilizando el Kit de Invitrogen, Vybrant FAM Caspase-3 y -7, basado en el uso del compuesto fluorescente inhibidor de caspasas FLICATM para detectar caspasas activas e ioduro de propidio (IP) para determinar la viabilidad celular. FLICA se compone de 3 subunidades: I) un resto de fluorometilcetona (FMK), que puede reaccionar covalentemente con una cisteína, II) una secuencia de reconocimiento específica de aminoácidos caspasa (DEVD) para la caspasa 3 y 7, y III) un grupo de fluoresceína que actúa como indicador de la reacción. El reactivo FLICA, no citotóxico, penetra al interior celular e interactúa con el centro reactivo enzimático de las caspasas activas por medio del DEVD y se une covalentemente a través del residuo FMK. Las moléculas de FLICA sin ligar se difunden fuera de la célula y son eliminadas. La fluorescencia verde remanente en las células es una medida directa de la cantidad de caspasa activa que estaba presente en el momento en que se añadió el inhibidor. El ensayo se realizó según el protocolo recomendado por la casa comercial y la detección de las células teñidas con FLICA y de las células viables (IP-) se realizó mediante citometría de flujo, utilizando los canales FL1H y FL2H, respectivamente. Para cada muestra se contaron 10.000 células.

D) Obtención del ADN genómico y ensayo de fragmentación del ADN. El ensayo de fragmentación del ADN es utilizado habitualmente para la distinción entre apoptosis y necrosis y es uno de los métodos más fiable para identificación de células en apoptosis. En el presente trabajo se utilizó el método de electroforesis en geles de agarosa seguido de tinción

con SYBR Green I (Molecular Probes) para determinar si el ADN de los leucocitos tratados con la cepa de *T. maritimum* durante 0, 45 minutos, 6 y 24 horas presentaban el patrón de fragmentación de ADN característico de las células en fase de apoptosis (fragmentos de 200-5000 pares de bases).

Para la extracción del ADN de los leucocitos infectados y leucocitos control (inoculado con PBS) se utilizó el kit Ultraclean Microbial DNA (MO BIO laboratorios), siguiendo la metodología recomendada por la casa comercial.

El ADN obtenido se analizó mediante electroforesis horizontal (100 V/1h) empleando geles de agarosa (tipo II, Sigma) preparados al 2% (p/v) en tampón Tris ácido acético EDTA (TAE, 40mM Tris, 20mM ácido acético, 1mM EDTA, pH 8,3) y suplementado con SYBR Green I (dilución 1/10000 v/v en la solución de agarosa-TAE). En el análisis se incluyó el marcador de masa molecular de 1 Kb (Thermo Scientific).

Los geles se visualizaron utilizando un transiluminador de luz ultravioleta (BioRad UV Transilluminator 2000) y fueron fotografiados usando una cámara Canon G9.

4.1.4.- Análisis estadístico

Todos los experimentos se hicieron por triplicado para cada pez, utilizando tres peces por ensayo. Los resultados se expresaron como la media geométrica \pm el error estándar (EE) de los datos analizados. Los resultados se analizaron usando un ANOVA de una vía y el test de Bonferroni, utilizando el modelo de U de Mann-Whitney para comprobar la heterogeneidad de dos muestras ordinales. Los análisis se realizaron utilizando el programa IBM SPSS Statistics 22 y en todos los casos se consideró un nivel de significación menor o igual a 0,05 ($p \leq 0,05$).

4.2.- Resultados

El objetivo del presente estudio fue la optimización de técnicas para el estudio de diferentes parámetros de la respuesta inmune humoral y celular no específica en rodaballo y lenguado.

4.2.1.- Estudio de la respuesta inmune inespecífica en rodaballo

Este estudio se centró en la puesta a punto de métodos para determinar las actividades lisozima y la vía alternativa del complemento así como la capacidad bactericida del suero de peces planos.

4.2.1.1.- Actividad lisozima

En este estudio se han evaluado dos métodos (turbidimétrico y en placa) para la determinación de la actividad lisozima en sueros de los peces inmunizados con antígenos de *T. maritimum* y suero de peces control (inyectados con FPBS-2). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 18.

Los sueros de peces inmunizados con el antígeno del patógeno mostraron niveles de actividad lisozima significativamente más elevados (855-1155 UE/ml) que los mostrados por los peces control (400-417 UE/ml), con independencia del método utilizado para la evaluación de la actividad enzimática.

No se han observado diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en los niveles de actividad detectados en suero en función del método de análisis utilizado.

La Fig 14 muestra los resultados del estudio de la actividad lisozima empleando el método de placa con o sin tinción con el colorante azul de Coomasie. Como se puede observar, la tinción de la agarosa con dicho colorante no mejora la visualización de la zona de lisis.

Tabla 12- Evaluación de métodos de determinación de la actividad lisozima del suero

Muestra de suero	Actividad lisozima	Actividad lisozima
	Método turbidimétrico	Método de placa
	Media (UE/ml)±EE	Media (UE/ml)±EE
<i>Control</i>	400,0±76,0	416,6±57,5
<i>Anti-T. maritimum</i>	1154,6±35,1*	855,1±20,6*

UE/ml, unidades enzimáticas/ml. EE, Error estándar. *Diferencia significativa entre inmunizado y control.

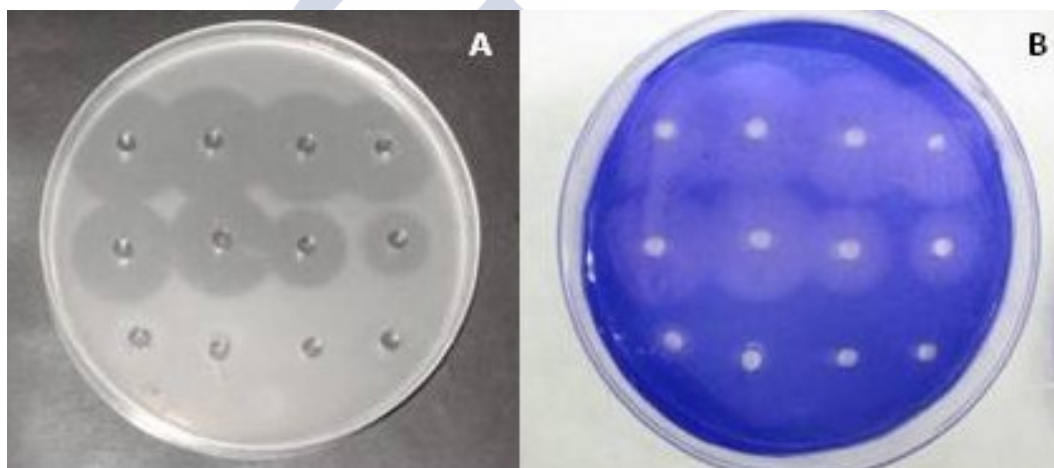


Figura 14.- Estudio de la actividad lisozima empleando el método de placa (A) y tras la tinción de la agarosa con azul Coomasie (B).

Tabla 13.- Evaluación de micro y macro-métodos para la determinación de la actividad bactericida del suero.

Muestra de suero	Actividad bactericida	Actividad bactericida
	Micro-método	Macro-método
	IB±EE	IB±EE
<i>Control</i>	0,9±0,0	1,0±0,0
<i>Anti-T. maritimum</i>	0,8±0,1	0,8±0,0

IB, índice bactericida, $IB = \frac{A_{620} \text{ de la muestra tratada con suero}}{A_{620} \text{ del control negativo}}$

EE, Error estándar

4.2.1.3.- Actividad de la vía alternativa del complemento

La Tabla 20 muestra los resultados del estudio de la actividad de la vía alternativa del complemento del suero de rodaballo, usando como diana eritrocitos humanos.

Los sueros de los peces previamente inmunizados con los antígenos de la bacteria *T. maritimum* mostraron valores CH₅₀ similares a los observados en el suero de peces control. En éste caso, tampoco se han observado diferencias significativas en los valores CH₅₀ en función del método de análisis utilizado.

Tabla 14.- Evaluación de micro y macrométodos para la determinación de la actividad complemento (vía alternativa) del suero de rodaballo.

Muestra de suero	Actividad complemento Micrométodo CH ₅₀ ±EE	Actividad complemento Macrométodo CH ₅₀ ±EE
Control	35,5±13,1	36,0±2,1
Anti- <i>T. maritimum</i>	35,3±16,2	37,4±3,2

CH₅₀, dilución del suero que causa un 50 % de hemólisis en una suspensión de eritrocitos.
EE, error estándar.

4.2.2. Optimización de métodos de estudio de la respuesta celular no específica

El principal objetivo de este estudio ha sido estandarizar técnicas rápidas, baratas y fiables para el estudio de la respuesta inmune celular no específica en rodaballo y lenguado.

4.2.2.1. Estudio de las poblaciones de leucocitos en rodaballo y lenguado

El análisis por citometría de las muestras de sangre, riñón y bazo de rodaballo y lenguado demostró la existencia de tres subpoblaciones leucocitarias distintas en base a su tamaño (FSC) y complejidad (SSC). El análisis bidimensional de las células permitió asignar cada subpoblación a un tipo celular, considerando las características de la relación FSC/SSC descritas por Stosik (2001): i) bajo FSC/bajo SSC (compatible con linfocitos), ii) medio FSC/bajo SSC (compatible con monocitos) y iii) alto FSC/alto SSC (compatible con granulocitos). Las figuras 15, 16 y 17, muestran los citogramas característicos de los leucocitos procedentes de sangre, riñón y bazo, respectivamente.

Se han observado diferencias en el porcentaje de células en las distintas poblaciones dependiendo del tejido de procedencia y/o de la especie de pez (Tabla 21). Así, se ha observado que en las muestras de sangre y bazo de rodaballo y lenguado, los linfocitos constituyen la población predominante (88 a 97% del total de leucocitos). En cambio, en el tejido renal del rodaballo dos tercios de la población de leucocitos está constituida por

linfocitos y un tercio por granulocitos, mientras que en el riñón de lenguado los linfocitos y los granulocitos se encuentran en proporciones similares (43% de linfocitos y 48% granulocitos).

Con el fin de desarrollar una técnica rápida para evaluar las poblaciones de leucocitos se comparó el método de extracción, con Ficoll con el de lisis hipotónica en muestras de sangre de lenguado y rodaballo. El análisis mediante citometría de flujo puso de manifiesto la existencia de ligeras variaciones en los perfiles celulares de las dos especies de peces probadas en función del método de obtención de los leucocitos (Tabla 22, Figura 18). Los

citogramas obtenidos con los leucocitos de sangre de rodaballo y lenguado obtenidos con Ficoll o por lisis hipotónica se muestran en la Figura 18. Sin embargo, se ha observado una reducción de la población de granulocitos en la sangre de lenguado cuando se utilizaba Ficoll como método de separación de los leucocitos.



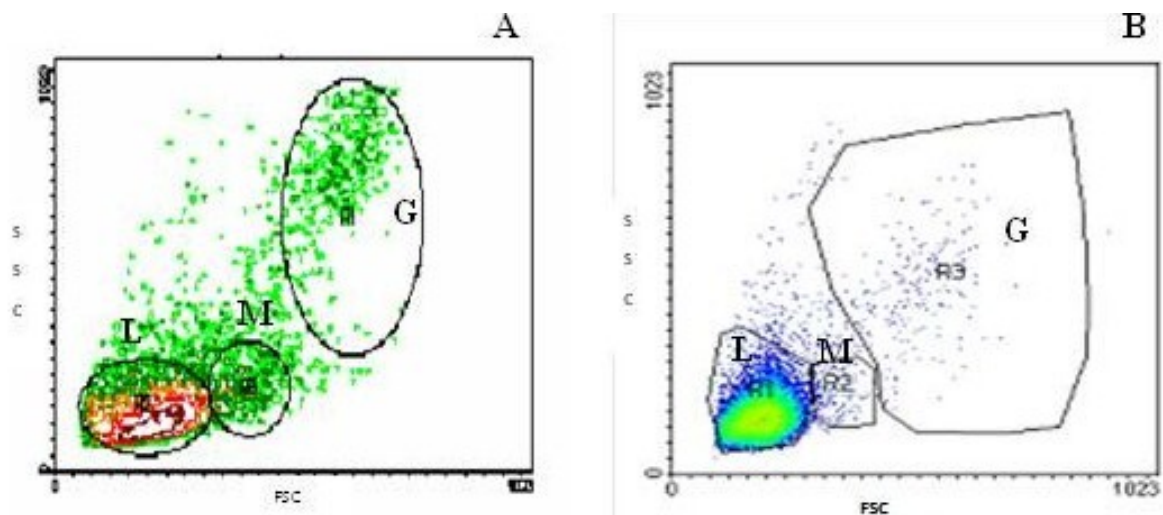


Figura 15 Perfil celular de sangre de rodaballo (A), y lenguado (B). Eje de ordenadas muestra el tamaño celular (FSC); Eje de abcisas muestra la complejidad celular (SSC). L (linfocitos), M (monocitos), G (granulocitos)

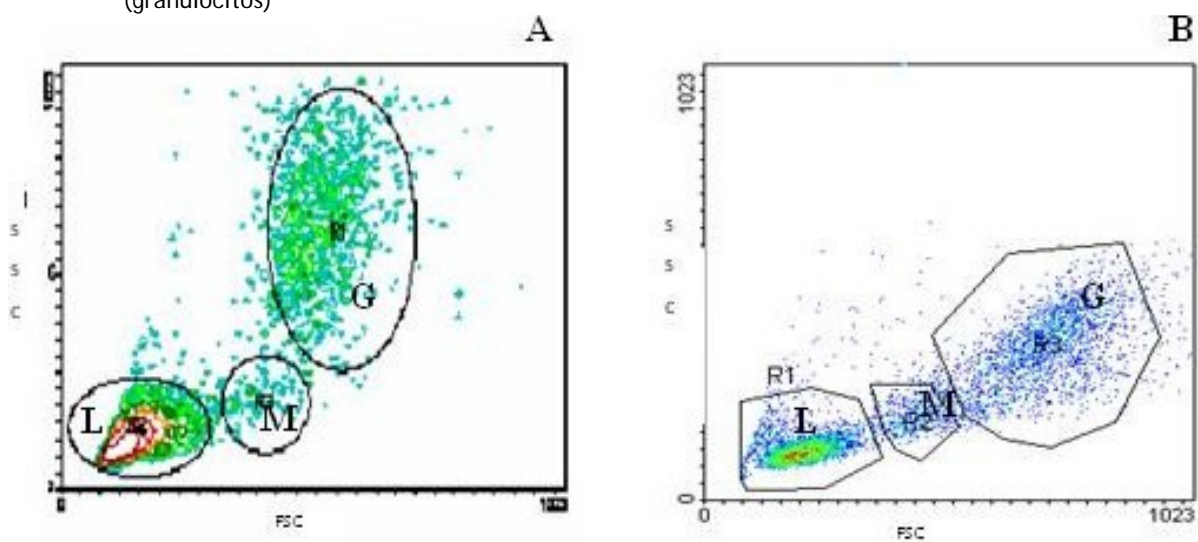


Figura 16.- Perfil celular de riñón de rodaballo (A) y lenguado (B). Eje de ordenadas tamaño (FSC); Eje de abcisas complejidad celular (SSC). L (linfocitos), M (monocitos), G (granulocitos).

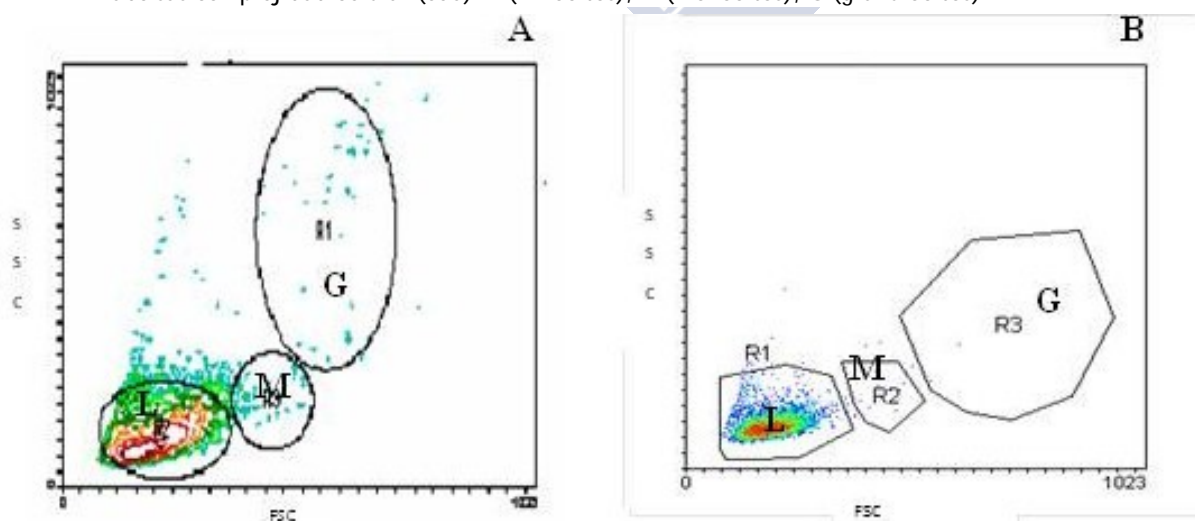


Figura 17 .- Perfil celular de bazo de rodaballo (A), y lenguado (B). Eje de ordenadas tamaño celular (FSC); Eje de abcisas complejidad celular (SSC). L (linfocitos), M (monocitos), G (granulocitos).

Tabla 15.- Porcentajes de cada subpoblación de leucocitos en sangre, riñón y bazo de las especies de peces en estudio.

Tipos Celulares	Rodaballo	Rodaballo	Rodaballo	Lenguado	Lenguado	Lenguado
	Riñón	Sangre	Bazo	Riñón	Sangre	Bazo
	Media (%)±EE	Media (%)±EE	Media (%)±EE	Media (%)±EE	Media (%)±EE	Media (%)±EE
Linfocitos	61,2%±4,4	88,3%±4,8	95,6%±5,6	43,4%±5,6	94,9%±5,2	96,9%±4,2
Monocitos	9,3%±1,4	2,1%±0,2	2,0%±0,1	8,79%±1,2	1,6%±0,0	1,5%±0,1
Granulocitos	30,5%±4,5	9,4%±1,3	2,4%±0,4	47,7%±5,3	3,7%±0,3	1,6%±0,2
EE Error estándar						

Tabla 16-.Porcentajes celulares en sangre de rodaballo y lenguado atendiendo al método de extracción.

Tipos celulares	Rodaballo		Lenguado	
	Lisis hipotónica (% Células) Media±EE	Ficoll (% Células) Media±EE	Lisis hipotónica (% Células) Media±EE	Ficoll (% Células) Media±EE
Linfocitos	87,9%±4,6	88,3%±5,0	88,8%±4,8	94,9%±5,0
Monocitos	2,7%±0,5	2,1%±0,4	3,7%±0,7	1,6%±0,4
Granulocitos	9,4%±1,0	9,6%±1,3	7,7%±1,2	3,7%±0,8
EE Error estándar				

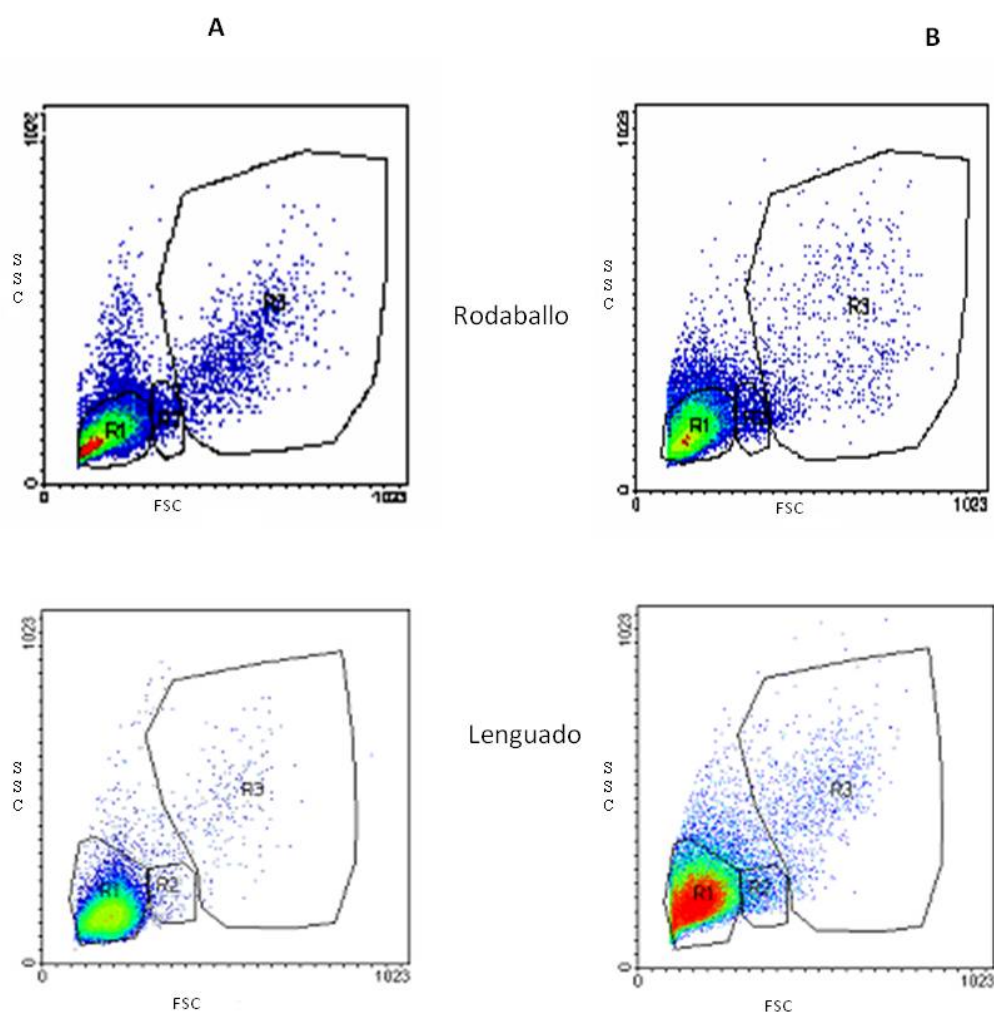


Figura 18.- Perfiles celulares en sangre de las distintas especies de peces utilizando como método de extracción Ficoll (A) y lisis hipotónica (B). Eje de ordenadas muestra el tamaño celular (FSC); Eje de abscisas muestra la complejidad celular (SSC). L, linfocitos; M, monocitos y G, granulocitos.

4.2.2.2- Ensayo de fagocitosis con linfocitos de rodaballo y lenguado

Con el fin de optimizar el ensayo de fagocitosis mediante citometría de flujo se evaluaron diferentes parámetros, incluyendo la concentración de la solución de FICT para el marcaje de las bacterias, la concentración de la solución de TB para el adecuado apagado de la fluorescencia de las bacterias, método de eliminación de la fluorescencia externa debida a las bacterias no ingeridas y la ratio bacterias:leucocitos.

En relación con el marcaje de las bacterias los resultados indican que la incubación de *T. maritimum* durante 12 horas con la solución de FICT de concentración 100µg/ml proporciona un marcaje homogéneo de la población bacteriana (mayor del 80%), como se observa en la Figura 19.

Con respecto al estudio de la estabilidad del marcado de las bacterias con FICT, los resultados obtenidos indicaron que las bacterias congeladas a -80°C y mantenidas en oscuridad mantenían el marcaje durante al menos seis meses. Sin embargo, se observaba un descenso de al menos un logaritmo en la fluorescencia de las bacterias transcurridos tres meses de conservación a 4°C como se muestra en la Figura 19.

Como se puede observar en la Figura 20 la incubación de *T. maritimum* durante 12 horas con una solución de FITC a una concentración de 100µg/ml proporciona un marcaje homogéneo (mayor del 80%) y estable (al menos seis meses mantenidas a -80°C) de la población bacteriana, si bien se observa un descenso de un logaritmo en la fluorescencia tras tres meses de conservación a 4°C.

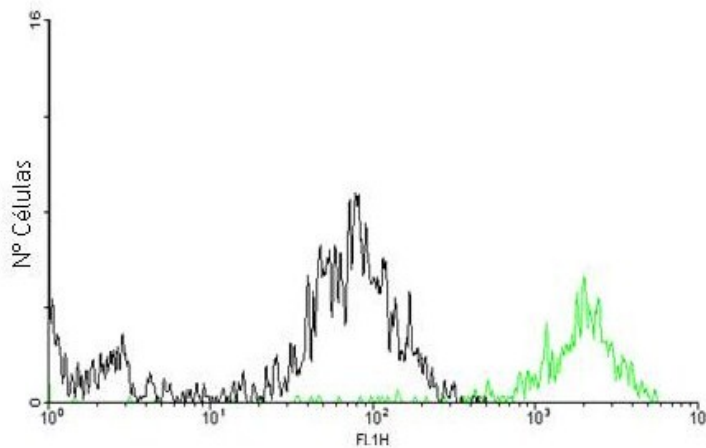


Figura 19 .- Niveles de fluorescencia de la suspensión bacteriana recién marcada (línea verde) y después de tres meses de almacenamiento a 4°C (línea negra). Eje de las abscisas muestra el número de células. Eje de las ordenadas muestra la fluorescencia detectada por el filtro verde (530/30 FICT).

Con respecto a la eliminación de la fluorescencia externa debida a bacterias no ingeridas, se observó que sólo utilizando la solución de TB al 2% se conseguía reducir la fluorescencia de las bacterias desde más del 80% hasta sólo un 4,2% (Figura 20A y B y Figura 21).

Además, se demostró que, aunque con el método de lavado se conseguía una reducción similar de los niveles de fluorescencia extracelular, este tratamiento también producía una pérdida de leucocitos.

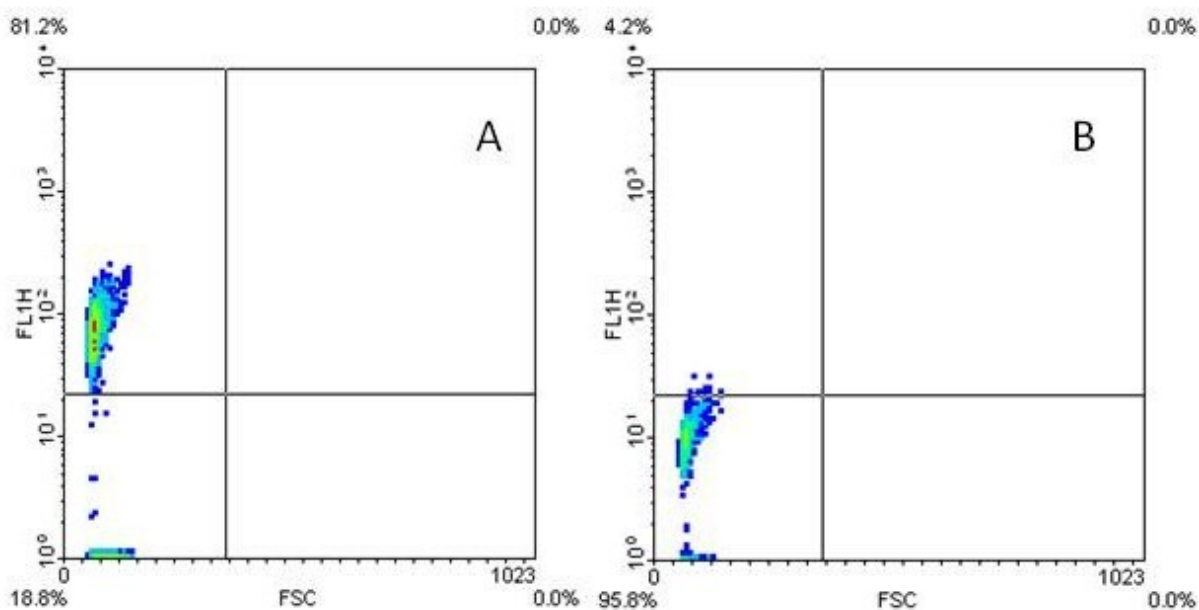


Figura 20 Fluorescencia de la población bacteriana marcada con FICT (A) y de la población apagada tras el tratamiento con TB al 2% (B). Eje de las abscisas muestra la fluorescencia detectada por el filtro verde FL1H (530/30, FICT); Eje de las ordenadas muestra el tamaño celular (FSC).

Otro de los parámetros evaluados durante la optimización del ensayo de fagocitosis fue el efecto de la concentración bacteriana sobre la actividad fagocítica de los macrófagos. Los resultados obtenidos demostraron que la ratio óptima leucocitos:bacterias para estimular la respuesta fagocítica era 1:100.

El experimento de fagocitosis, realizado con leucocitos de lenguado y rodaballo, muestra una notable actividad fagocítica en los granulocitos de riñón cefálico de ambas especies, manifestándose activas el 45% de la población de granulocitos en el caso de rodaballo y aproximadamente el 30% de los granulocitos de lenguado tras la incubación durante 45 min con la cepa LL01.8.3.8 de *T. maritimum* (Tabla 23). Las Figuras 22 y 23 muestran las diferencias entre bacterias no ingeridas, granulocitos que han fagocitado a alguna bacteria y granulocitos que no han interiorizado bacterias en base a la fluorescencia y tamaño celular (FSC) cuando se utilizan leucocitos de rodaballo y lenguado, respectivamente.

Tabla 17.- Capacidad fagocítica de los granulocitos (porcentaje) de lenguado y rodaballo empleando la cepa LL01.8.3.8 de *T. maritimum*.

Especie	Fagocitosis t=0	Fagocitosis t=45
	Media \pm EE	Media \pm EE
Rodaballo	2,3 \pm 0,4	43,1 \pm 1,7*
Lenguado	6,1 \pm 1,3	28,5 \pm 0,9*

* Indica diferencias significativas ($p < 0,05$). t=0, sin incubación; t=45, incubación durante 45 minutos
EE, desviación estándar

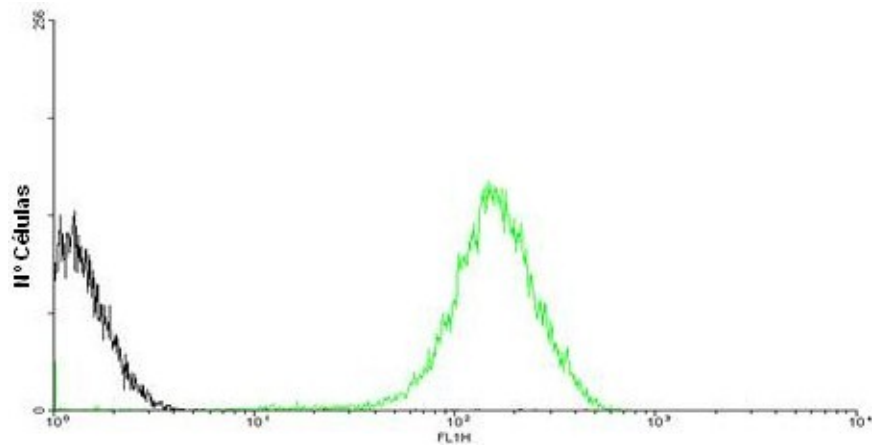


Figura 21.- Niveles de fluorescencia de la suspensión bacteriana antes (verde) y después (negra) del apagado con TB al 2%. Eje de las abscisas muestra el número de células. Eje de las ordenadas muestra la fluorescencia detectada por el filtro verde FL1H (530/30, FICT)

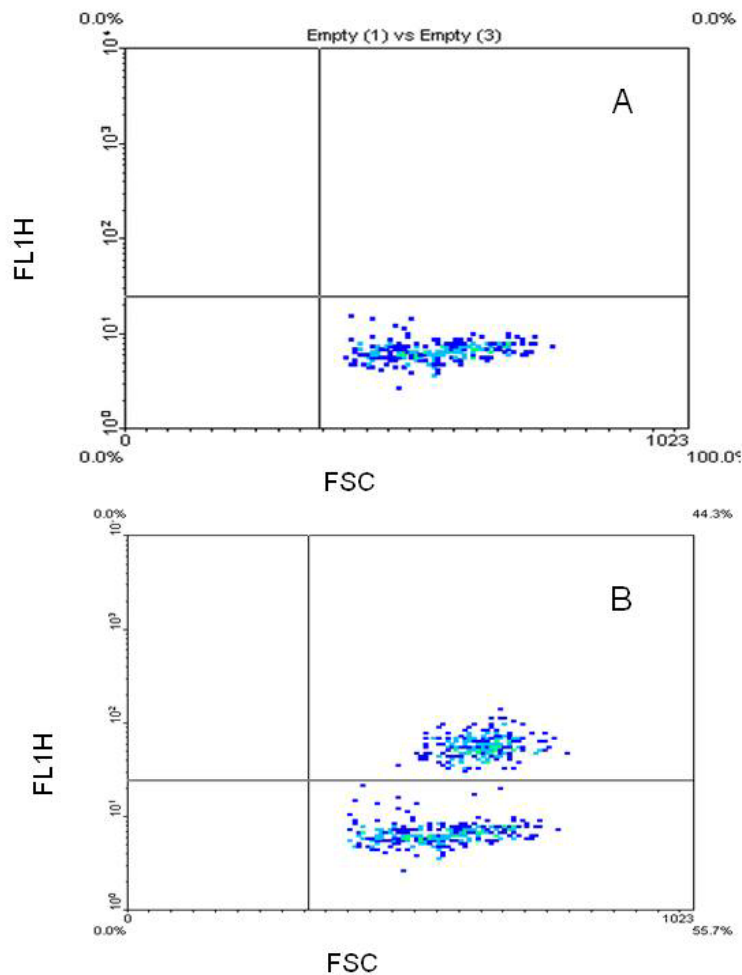


Figura 22.- Ensayo de fagocitosis con leucocitos de rodaballo. (A) control negativo del ensayo (B) células bacterianas fagocitadas tras 45 minutos de incubación. Eje de las abscisas muestra la fluorescencia detectada por el filtro verde FL1H (530/30, FICT), Eje de ordenadas muestra el tamaño celular (FSC).

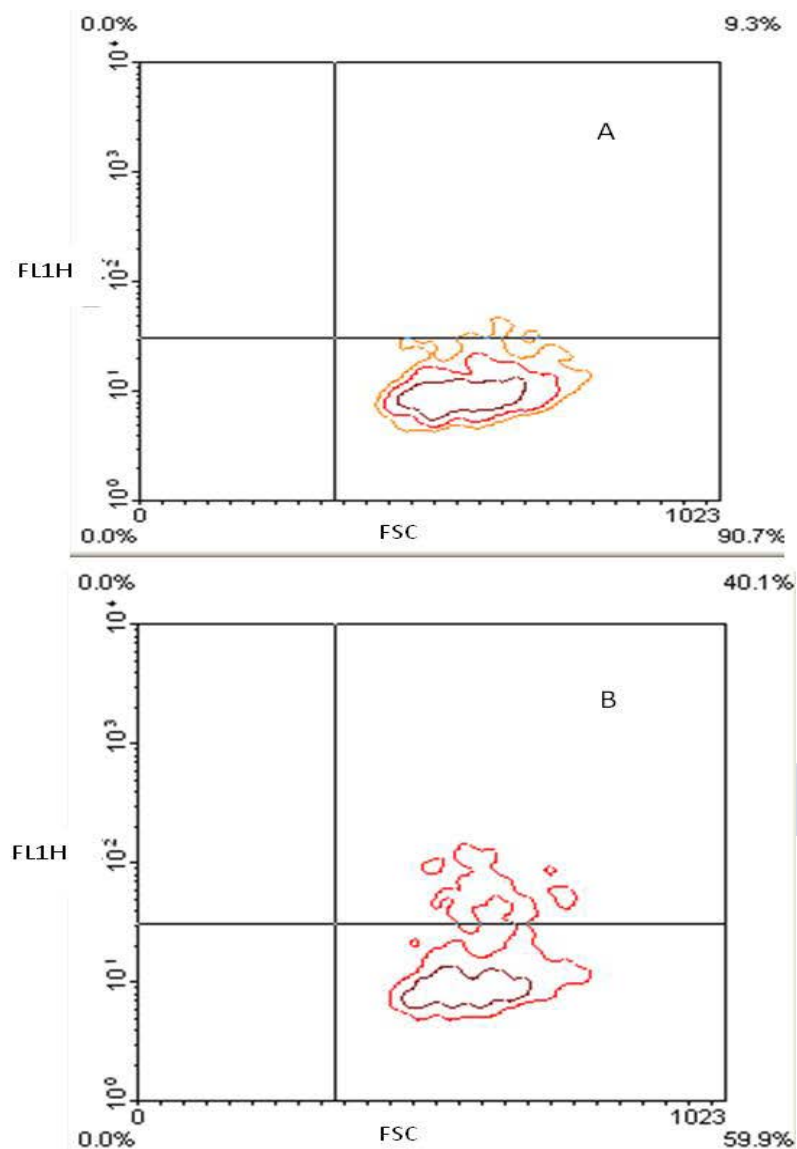


Figura 23.- Ensayo de fagocitosis con leucocitos de lenguado. (A) control negativo del ensayo (B) células bacterianas fagocitadas tras 45 minutos de incubación. Eje de las abscisas muestra la fluorescencia detectada por el filtro verde FL1H Eje de ordenadas muestra el tamaño celular (FSC).

4.2.2.3.- Estudio de la actividad estallido respiratorio

Con el fin de optimizar el ensayo de actividad estallido respiratorio se realizó un estudio de la cinética de la reacción tras la adición de un activador soluble, PMA a los leucocitos de riñón y sangre de rodaballo y lenguado. Los resultados demostraron que con independencia del órgano de obtención de los leucocitos la actividad respiratoria alcanzaba los máximos niveles a los 45 minutos de adición del PMA en el caso de rodaballo (Figura 24) y a los 60 minutos en el del lenguado (Figura 25) y que éstos niveles de activación se mantenían, con mínimas fluctuaciones, hasta las dos horas de incubación (dato no mostrado).

Los resultados obtenidos en el ensayo de evaluación de la actividad respiratoria demuestran que los leucocitos de riñón anterior de rodaballo y lenguado estimulados con PMA muestran índices de estimulación (IE) de $17,7 \pm 5,0$ y $16,7 \pm 5,3$, respectivamente (Tabla 24), existiendo células muy activas (picos de fluorescencia entre 10^3 y 10^4), células con moderada actividad (picos de fluorescencia entre 10^2 y 10^3) y células con baja actividad (picos con fluorescencia entre 10^1 y 10^2) (Figura 26).

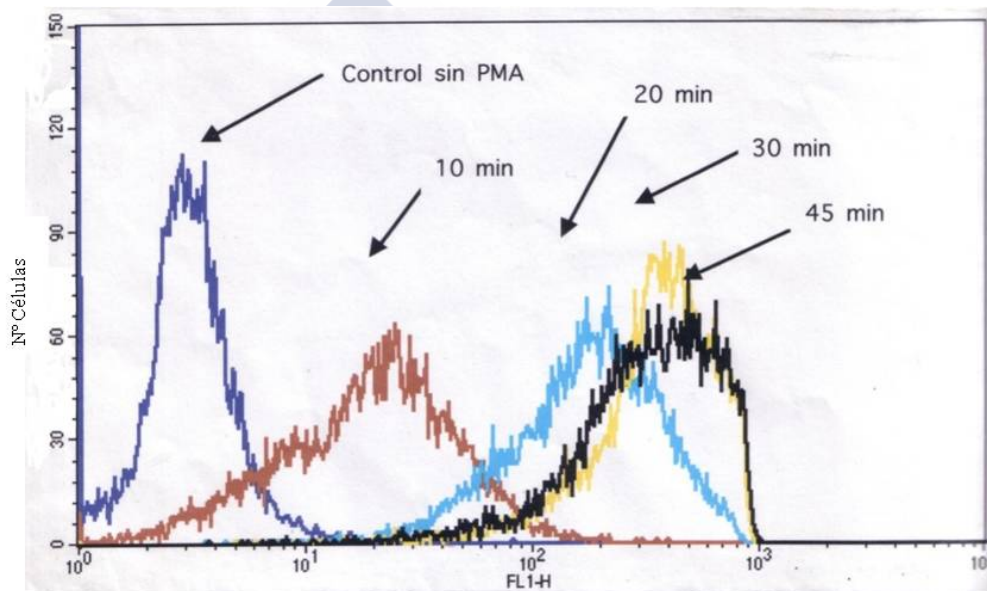


Figura 24.- Cinética del estallido respiratorio en leucocitos de riñón de rodaballo estimulados con PMA. Eje de las abscisas muestra el número de células. Eje de las ordenadas muestra la fluorescencia detectada por el filtro verde FL1H (530/30).

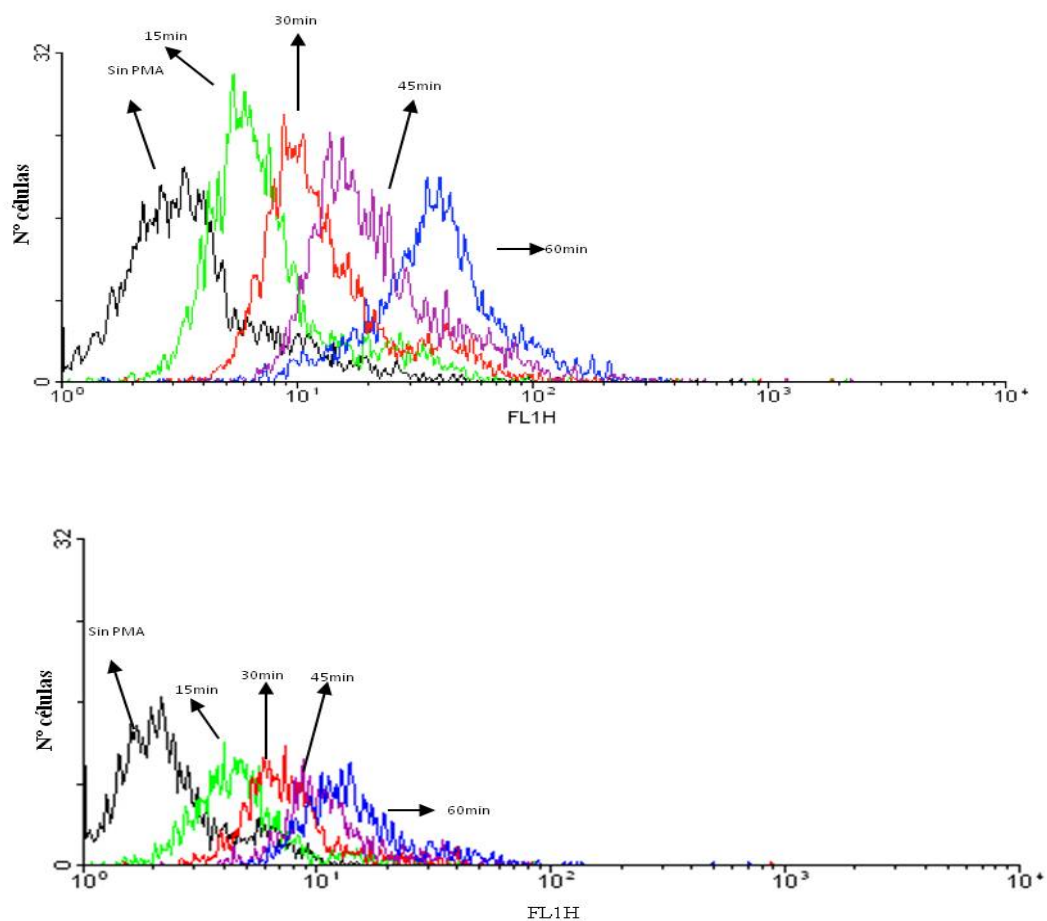


Figura 25.- Cinética del estallido respiratorio en leucocitos de riñón (A) y sangre (B) de lenguado estimulados con PMA. Eje de las abscisas muestra el número de células. Eje de las ordenadas muestra la fluorescencia detectada por el filtro verde FL1H (530/30).

Tabla 18.- Actividad respiratoria, expresada como índice de estimulación (IE) de los leucocitos de riñón de rodaballo y lenguado estimulados con PMA.

Especie de pez	Leucocitos	IE Media± EE
Rodaballo	Sangre	3,1±0,40
	Riñón	17,7±5,0
	Bazo	2,4±0,62
Lenguado	Sangre	1,1±0,4
	Riñón	16,7±5,3
	Bazo	1,0±0,5

Índice de estimulación (IE)= media geométrica de la intensidad de fluorescencia en leucocitos estimulados con PMA/media geométrica de la intensidad de fluorescencia en muestras no estimuladas. El valor se expresa como la media ± Error Estándar (EE).

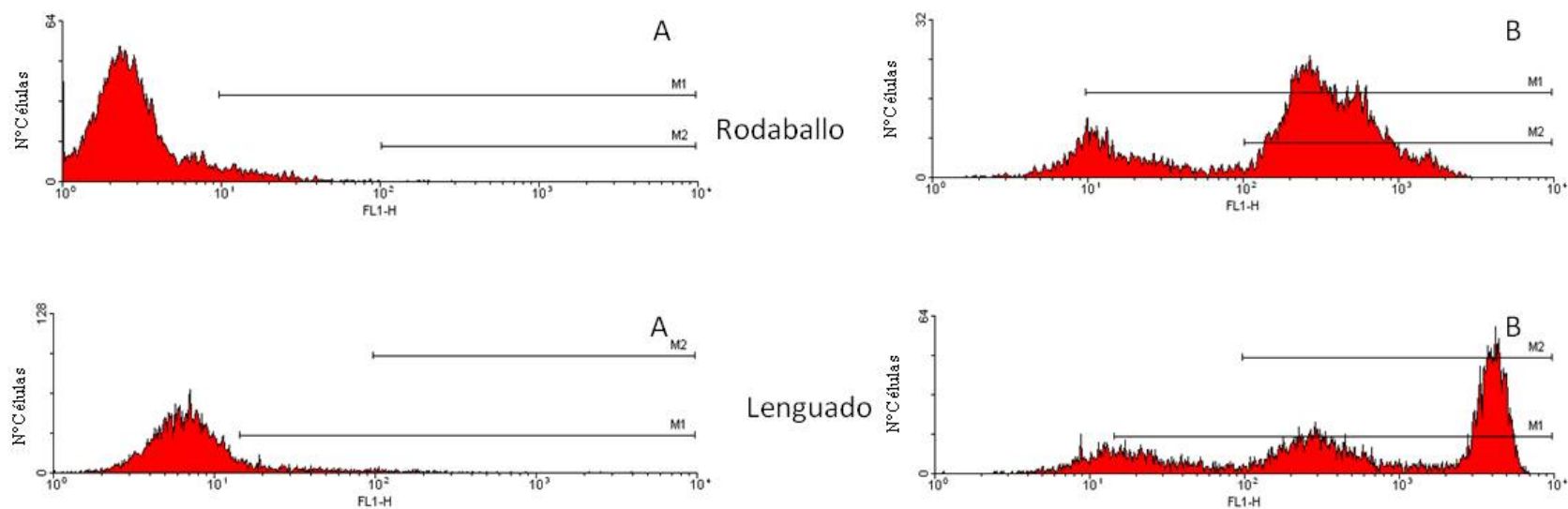


Figura 26.- Estallido respiratorio en leucocitos de riñón de rodaballo y lenguado, no activados (A) y activados (B) Eje de las ordenadas muestra el número de células. Eje de las abscisas muestra la fluorescencia detectada por el filtro verde FL1H (530/30). (M1 células con fluorescencia mayor a 10^1 ; M2 células con fluorescencia mayor de 10^2).

Con respecto al efecto del método de extracción de los leucocitos sobre la actividad estallido respiratorio, se ha observado que los leucocitos obtenidos a partir de la sangre utilizando el método de lisis hipertónica mostraban un IE ($IE = 2.2 \pm 0.8$) significativamente más reducido que los obtenidos con Ficoll ($IE = 19.3 \pm 9.1$). Con el fin de determinar si la reducción en la actividad respiratoria era debida a la pérdida de viabilidad de los leucocitos, se repitieron los ensayos añadiendo yoduro de propidio.

En el presente estudio se evaluó el efecto de la estimulación con activadores solubles (PMA) y no solubles (suspensión bacteriana) en la actividad respiratoria de leucocitos de riñón anterior de rodaballo y lenguado. El índice de estimulación de leucocitos activados con PMA o con PMA y *Tenacibaculum maritimum*, fue superior al observado en los leucocitos estimulados sólo con la bacteria (Tabla 25).

Tabla 19.- Actividad respiratoria, expresada como índice de estimulación (IE) de los leucocitos de rodaballo y lenguados estimulados con activadores solubles y particulados.

Activador	Leucocitos Rodaballo (IE)	Leucocitos Lenguado (IE)
PMA	11,6 \pm 4,8	6,30 \pm 0,6
<i>T. maritimum</i>	0,8 \pm 0,0	0,98 \pm 0,0
<i>T.maritimum</i> + PMA	6,7 \pm 0,9	5,63 \pm 1,5

Índice de estimulación (IE) = media geométrica de la intensidad de fluorescencia en leucocitos estimulados con PMA/media geométrica de la intensidad de fluorescencia en muestras no estimuladas. El valor se expresa como la media \pm Error Estándar (EE).

El efecto del tiempo de incubación con los activadores sobre la actividad estallido respiratorio de los leucocitos de riñón anterior de rodaballo se muestra en la Tabla 26 y Figura 27. La mayor actividad se observó en los leucocitos tratados durante 45 minutos con PMA ($IE = 22,2$) y con la mezcla de PMA y bacterias ($IE = 16,1$), seguidos por los tratados sólo con bacterias ($IE = 5,3$). Además, se observó un cambio en la distribución de las poblaciones de leucocitos en función de su grado de activación (Figura 27). Así, los leucocitos estimulados durante 45 min con PMA están muy activos (picos de fluorescencia entre 10^3 y 10^4), mientras que cuando se prolonga la incubación durante 6 y 24h las células muestran una actividad moderada (picos de fluorescencia entre 10^2 y 10^3) o baja (picos con fluorescencia entre 10^1 y 10^2) (Figura 27B). Se observa un efecto similar al incubar los leucocitos con los dos activadores (bacterias y PMA) (Figura 27D). Sin embargo, cuando se estimulan los leucocitos sólo con bacterias existe una activación baja o moderada (Figura 27C) que no difiere de la observada en los leucocitos no estimulados (Figura 27A), independientemente del período de estimulación.

Tabla 20.- Efecto del tipo de activador y tiempo de activación sobre el estallido respiratorio de los leucocitos de riñón anterior de rodaballo.

Estímulo	Tiempo de estimulación		
	T=45min	T=6 horas	T=24 horas
	IE	IE	IE
PMA	22,2	8,4	1,8
<i>T. maritimum</i>	5,3	2,7	2,9
<i>T.maritimum</i> + PMA	16,1	6,2	1,2

IE; Índice de estimulación , $IE = \frac{\text{GMFI de leucocitos estimulados}}{\text{GMFI de leucocitos no estimulados}}$.

T tiempo que está en contacto con cada uno de los estímulos.

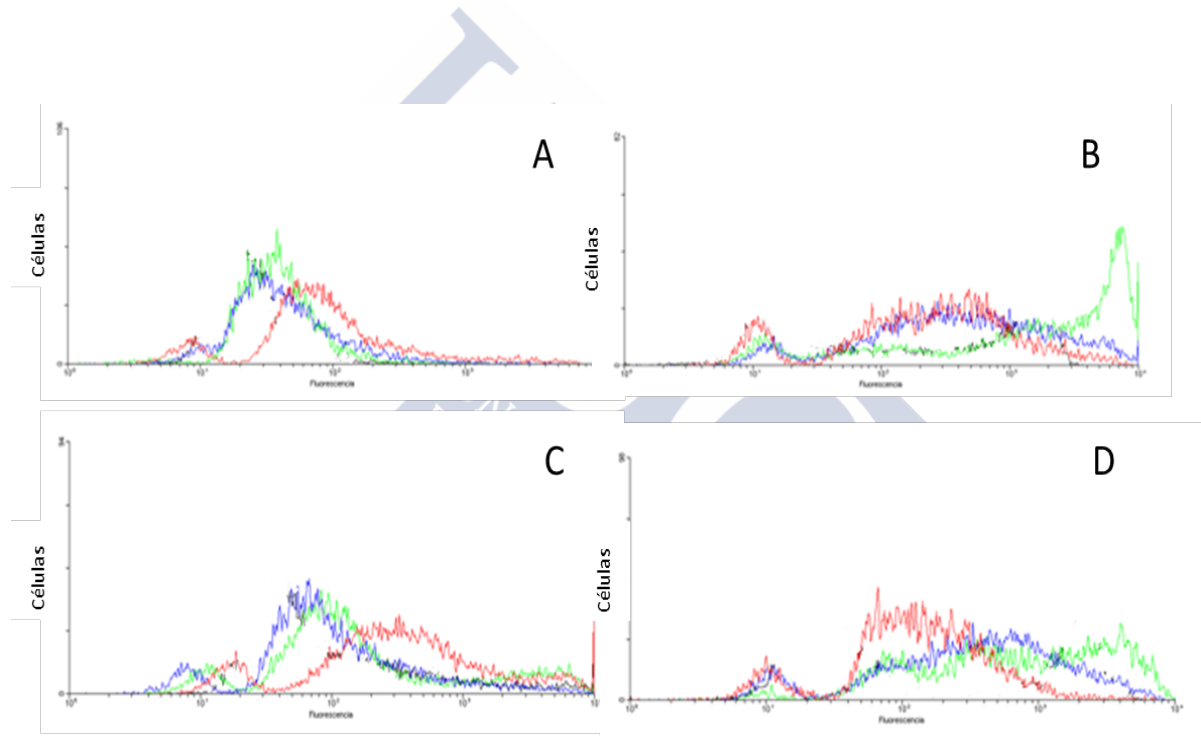


Figura 27.- Fluorescencia de leucocitos a los distintos estimulantes (A; control, B; PMA, C; *T. maritimum*; D; PMA+ bacteria) y diferentes tiempos de estimulación (verde 45 min, azul 6 horas, rojo 24 horas). Eje de las abscisas muestra el número de células. Eje de las ordenadas muestra la fluorescencia detectada por el filtro verde FL1H (530/30).

4.2.2.5.- Actividad citotóxica

Para la optimización de la actividad citotóxica se han evaluado dos tipos de células diana, CCL-214 (linfoma humano) y EPC (Epitelioma papuloso de carpa), y tres mezclas de células efectoras:diana a distintos ratios (100:1, 50:1 y 20:1).

Los resultados indican que las condiciones óptimas para la valoración de la actividad citotóxica natural de los leucocitos de riñón de rodaballo y lenguado son, incubación a la temperatura óptima de cada especie de pez (16°C para rodaballo y 18°C en lenguado) y uso de una ratio 20:1 leucocitos:célula diana.

Cuando se utilizaron en el ensayo las células EPC como diana se obtuvieron resultados menos repetitivos.

Los resultados del ensayo de actividad citotóxica natural utilizando las células CCL-214 marcadas con DIO como diana y como células efectoras leucocitos de riñón de rodaballo o de lenguado, demostraron que los leucocitos obtenidos a partir de ambas especies de peces producían mortalidad de las células CCL-214 con porcentajes de actividad citotóxica entre 24 y 31% (Figura 28). Los resultados obtenidos tras la incubación de las células diana con los leucocitos de rodaballo y lenguado se muestran en las Figuras 29 y 30, respectivamente. En estas Figuras se observa claramente la diferencia entre la mortalidad espontánea de las células diana (Panel A de las Figuras 29 y 30) y la producida por el contacto con los leucocitos de peces (Panel B de las Figuras 29 y 30).

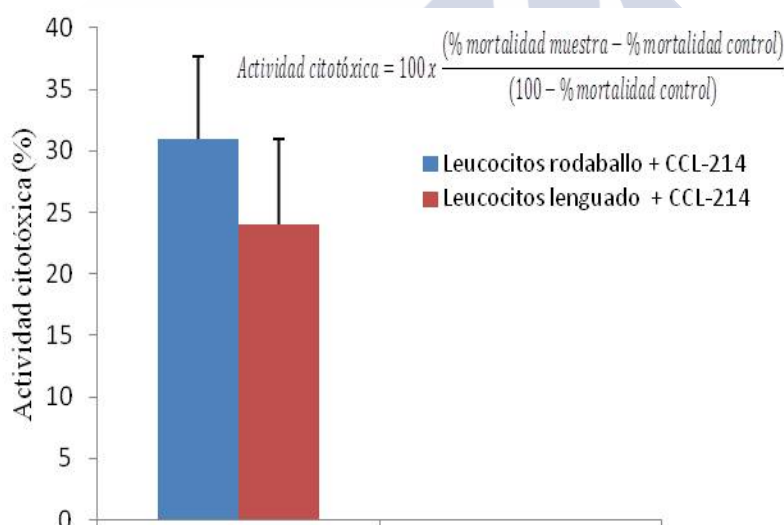


Figura 28.- Actividad citotóxica natural utilizando como células efectoras leucocitos de rodaballo y lenguado y como células diana las células tumorales CCL-214.

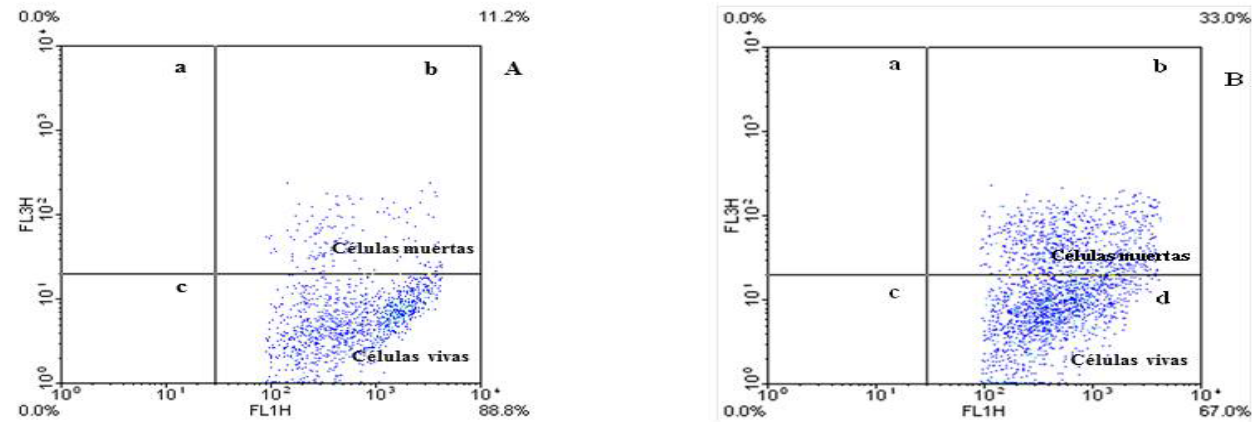


Figura 29.- Evaluación de la actividad citotóxica natural de leucocitos de riñón de rodaballo. (A) células diana control, (B) Células diana tras 2h de incubación con los leucocitos de riñón de rodaballo. Eje de las ordenadas muestra la fluorescencia del IP (células muertas). Eje de las abscisas muestra la fluorescencia emitida por el DIO (Células diana vivas).

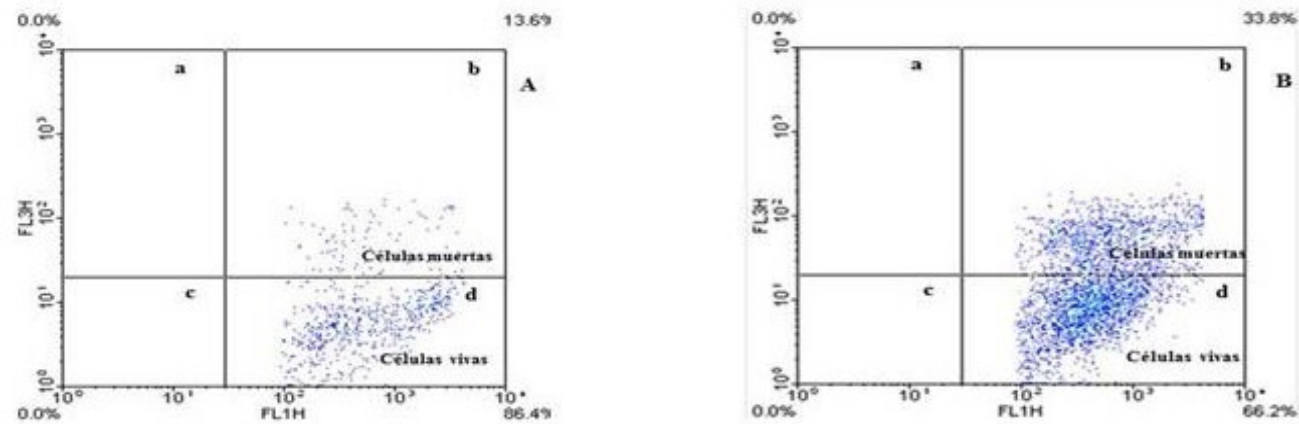


Figura 30.- Evaluación de la actividad citotóxica natural de leucocitos de riñón de lenguado. (A) Células diana tras 2h de incubación con los leucocitos de riñón de rodaballo. Eje de las ordenadas muestra la fluorescencia del IP (células muertas). Eje de las abscisas muestra la fluorescencia emitida por el DIO (Células diana vivas).

4.2.2.5.- Proliferación de linfocitos

Con el fin de optimizar el ensayo de linfoproliferación se evaluó el efecto de diferentes mitógenos (LPS, PMA, y la bacteria *T. maritimum*) y la temperatura de incubación de los leucocitos (9°C, 16°C y 19°C).

La Figura 31 muestra los patrones de distribución de ADN en los leucocitos de riñón no estimulados (A). El pico mayor representa las células en el estadio previo a la replicación del ADN (fase G0/G1), el pico más pequeño las células después de la replicación del ADN (fase G2/M) y entre ambos picos se distribuye la población de células cuyo ADN se está replicando (fase S). Como se observa en la Figura 31B la adición de mitógeno (PMA) produjo un incremento en la cantidad de leucocitos en las fases S y G2/M.

Con respecto a la temperatura de incubación, se ha observado que cuando se utilizó la temperatura de 9°C se obtuvieron ciclos más limpios y un mayor efecto del mitógeno (PMA). Cuando los leucocitos estimulados con el mitógeno se incuban a 16°C (leucocitos de rodaballo) o a 19°C (leucocitos de lenguado), la proporción de células en fase G2 disminuye a menos de la mitad respecto al tubo control, en cambio en el tubo incubado a 9°C se duplica la fase G2. En base a estos resultados, el resto del estudio se realizó incubando los leucocitos a 9°C.

El efecto de los mitógenos LPS, PMA y bacteria, sobre la capacidad de proliferación de los leucocitos de riñón, bazo y sangre se muestran en la Tabla 27.

Se han observado diferencias en función de la procedencia de los leucocitos y del mitógeno utilizado. Así, en riñón y sangre, se produjo un sensible incremento de las fases S y G2 tras la incubación con PMA, mientras que en bazo el LPS es el mitógeno que estimula una mayor proliferación de los leucocitos. Cuando se utilizan las bacterias como agente estimulador, el riñón es el órgano donde se encuentra el mayor número de leucocitos en fase G2.

4.2.2.6. Estudio de la apoptosis leucocitaria

En el presente estudio se han optimizado métodos de estudio de la apoptosis en leucocitos de rodaballo, basados en el uso de citometría de flujo. Con este fin se evaluaron: i) la pérdida de potencial de la membrana mitocondrial; ii) niveles de caspasas efectoras 3 y 7; iii) fragmentación del ADN genómico.

Los resultados del ensayo de determinación de la pérdida de potencial de membrana mitocondrial, tras la exposición de los leucocitos a PMA, bacterias y la mezcla de ambos, evaluado utilizando 123-DHR como sonda se muestran en la Figura 32. En las gráficas del potencial de membrana observamos tres subpoblaciones que se corresponden con i) células con alto potencial de membrana ($FL1H > 10^3$), ii) células con potencial de membrana medio ($FL1H$ entre 10^1 - 10^3) y iii) células con bajo potencial de membrana ($FL1H < 10^1$). Analizando los resultados en base al tipo de leucocitos, sólo el tratamiento con bacterias aumenta la subpoblación de linfocitos con bajo potencial de membrana mitocondrial, independientemente del período de incubación. Por el contrario, en el caso de los macrófagos el potencial de membrana mitocondrial se encuentra modificado respecto al control, aumentando las subpoblaciones de macrófagos con alta y media fluorescencia cuando se incuban las células con PMA o la mezcla de PMA y bacterias y reduciéndose estas subpoblaciones cuando las células se tratan sólo con bacterias. Las subpoblaciones con bajo potencial de membrana podrían corresponderse con las células que están iniciando el proceso de apoptosis.

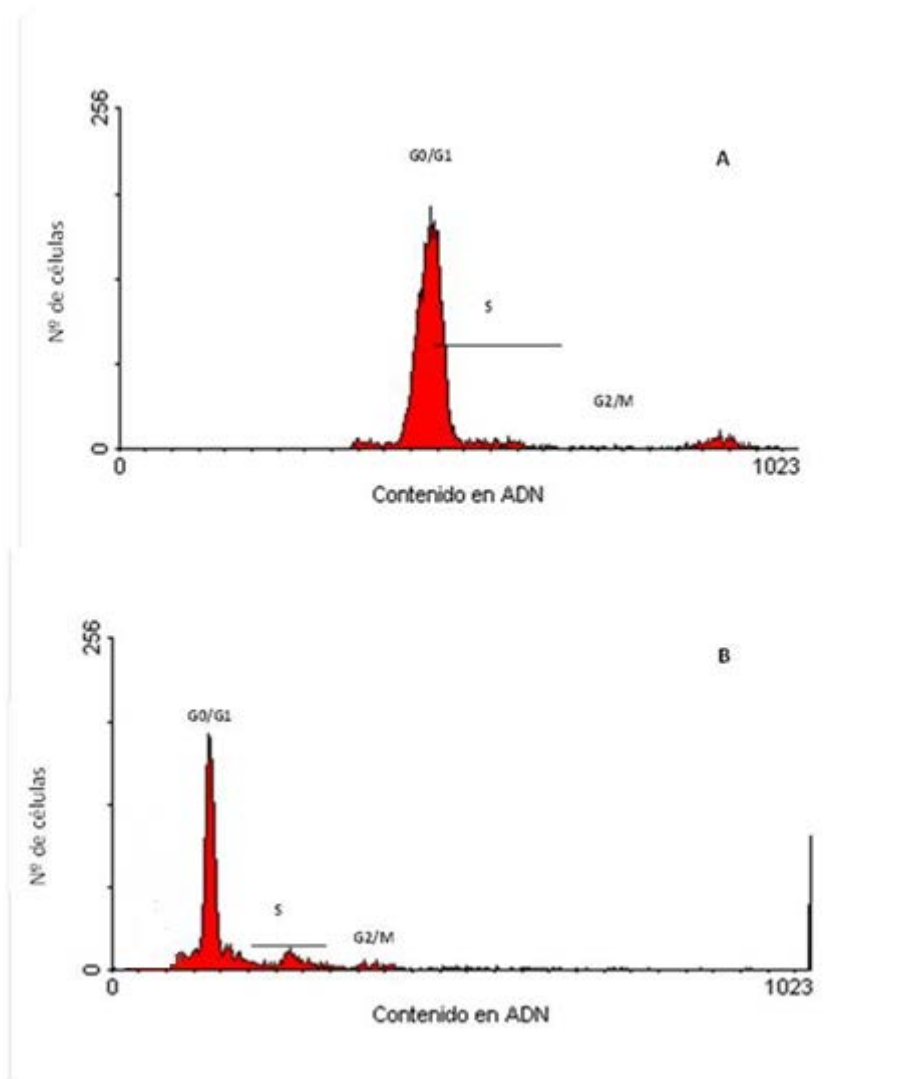


Figura 31.- Histogramas que muestran la distribución de contenido de ADN en leucocitos no estimulados (A) o estimulados con PMA (B).

Tabla 21.- Porcentaje de células en cada fase del ciclo celular (media±EE).

	Control			LPS			PMA			Bacteria		
	G0/G1	S	G2	G0/G1	S	G2	G0/G1	S	G2	G0/G1	S	G2
	% Células	% Células	% Células	% Células	% Células	% Células	% Células	% Células	% Células	% Células	% Células	% Células
	Media±EE	Media±EE	Media±EE	Media±EE	Media±EE	Media±EE	Media±EE	Media±EE	Media±EE	Media±EE	Media±EE	Media±EE
Sangre	93,8%±1,1	5,4%±0,2	1,4%±0,2	86,2%±0,7	11,3%±0,3	1,8%±0,1	90,0%±1,3	6,7%±0,4	3,4%±0,4	ND	ND	ND
Riñón	84,0%±0,8	11,5%±0,4	4,7%±0,3	78,6%±0,3	16,1%±0,2	6,0%±0,4	83,8%±1,1	9,1%±0,8	5,8%±1,1	78,2±0,6	18,4±1,3	3,2±0,9
Bazo	90,5%±1,1	6,8%±0,4	2,8%±0,1	80,7%±1,2	13,0%±0,9	5,5%±0,6	91,6%±1,6	6,8%±0,6	2,5%±0,6	83,0±4,4	14,3±1,7	2,8±0,8

(EE Desviación estándar; G0/G1 Se produce la acumulación de ATP necesario para la división. Célula con una sola copia de DNA; S Se produce la replicación y síntesis del DNA nuclear; G2 Preparación de la mitosis, la célula tiene duplicado el material genético).

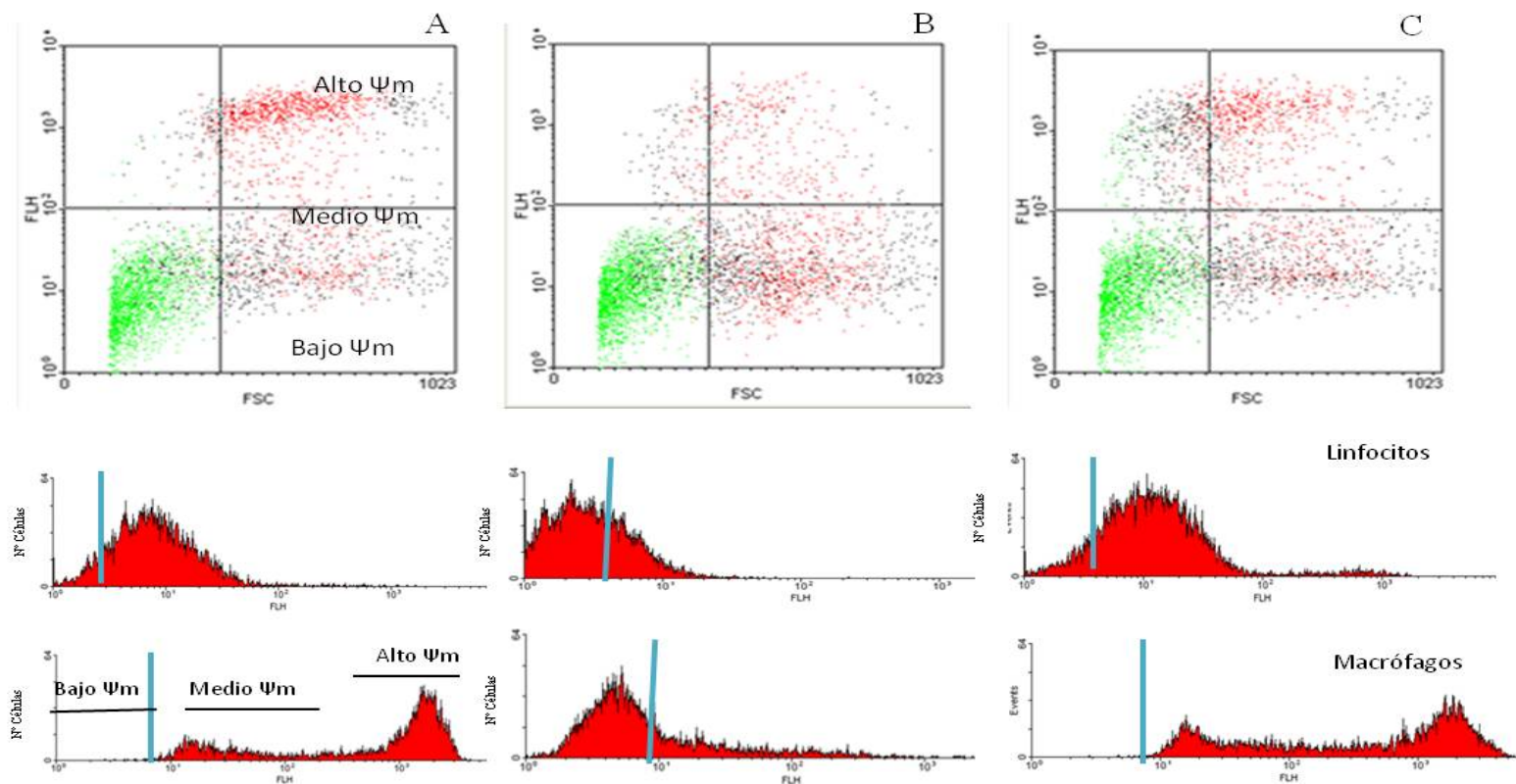


Figura 32.- Citogramas e histogramas que muestran la disipación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) tras la incubación de los leucocitos durante 2 h con PMA (A), *T. maritimum* (B) y *T. maritimum*+PMA (C) y control no tratado (D), utilizando como sonda 123-DHR. En el citogramas el eje de las ordenadas muestra la fluorescencia emitida por la rodamina 123 y el eje de las abscisas la distribución de los leucocitos en base a su complejidad (FSC). La sonda es absorbida por las células vivas, acumulándose en las mitocondrias energizadas. El grado de captación de la sonda, medido como la intensidad de fluorescencia celular, es proporcional al potencial de la membrana mitocondrial. El color rojo refleja el potencial de membrana de los macrófagos y en verde el de los linfocitos. Bajo Ψ_m , 10^0 - 10^1 , Medio Ψ_m , 10^1 - 10^2 , Alto Ψ_m , $>10^2$. La línea azul vertical muestra el valor medio de fluorescencia en el control, para identificar el desplazamiento producido por los tratamientos.

Para la evaluación de los niveles de caspasas efectoras se emplearon los reactivos ioduro de propidio (IP) (FL2H), como marcador del ADN de células muertas y FLICA (FL1H) para la detección de las caspasas efectoras 3 y 7.

La Tabla 28 y la Figura 33 muestran los resultados del estudio de la apoptosis de leucocitos de rodaballo, basado en la activación de las caspasas efectoras 3 y 7 tras 45 minutos de incubación con PMA, bacterias o ambos.

La estimulación con PMA no induce apoptosis en los leucocitos, sin embargo sí se observa un aumento de células preapoptóticas (Flica+/IP-) y apoptóticas (Flica+/IP+) cuando se incuban los leucocitos con la bacteria *T. maritimum* o cuando los leucocitos son sometidos a la acción conjunta del PMA y *T. maritimum* (Tabla 28, Figura 33).

Tabla 22.- Actividad de las caspasas efectoras 3 y 7 tras la incubación con el activador soluble (PMA), con células de *T. maritimum* o ambos

Estimulado por	% de células V Flica-/IP-	% de células M Flica-/IP+	% de células A Flica+/IP+	% de células pA Flica+/IP-
Control	90,0±1,4	1±0,0	5,5±2,1	3,5±0,7
PMA	93,5±3,5	1,5±2,1	2±1,4	3±0,0
<i>T. maritimum</i>	68,5±3,5	0,5±0,7	17,5±4,5	13±2,4
<i>T. maritimum</i> + PMA	85,5±9,9	1,5±2,1	6±5,6	7±1,4

Flica-/IP-, células viables (V); Flica-/IP+, células muertas (M); Flica+/IP+, células apoptóticas (A); Flica+/IP-, células preapoptóticas (pA).

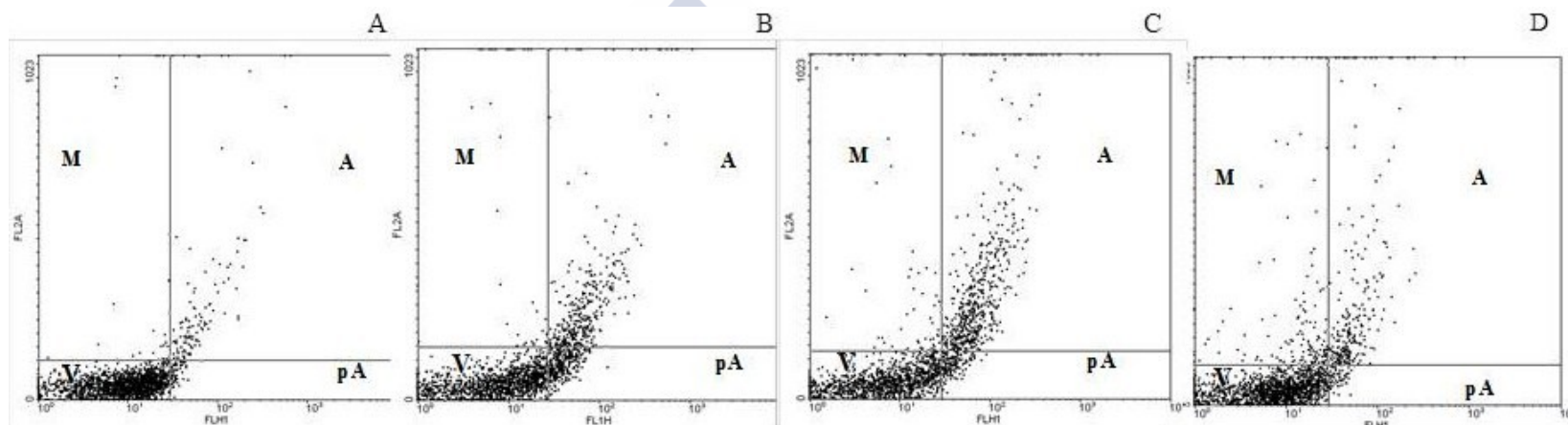


Figura 33.- Citogramas que muestran la distribución de los leucocitos control no tratados (A) o tratados durante 45 min con PMA (B), *T. maritimum* (C) y *T. maritimum*+PMA (D), utilizando como sondas IP y FLICA. El eje de las ordenadas muestra la fluorescencia emitida por el IP y el eje de las abscisas la fluorescencia emitida por FLICA. V (Flica-/IP-), células viables; M (Flica-/IP+), células muertas; pA (Flica+/IP-), células preapoptóticas; A (Flica+/IP+), células apoptóticas.

En el presente estudio se ha evaluado además el efecto de la incubación con PMA, bacteria o una mezcla de PMA y bacterias sobre el ADN de los leucocitos. Los resultados obtenidos indican que 24 horas post-incubación no se observan bandas de degradación de ADN con ninguno de los tratamientos (Figura 34).

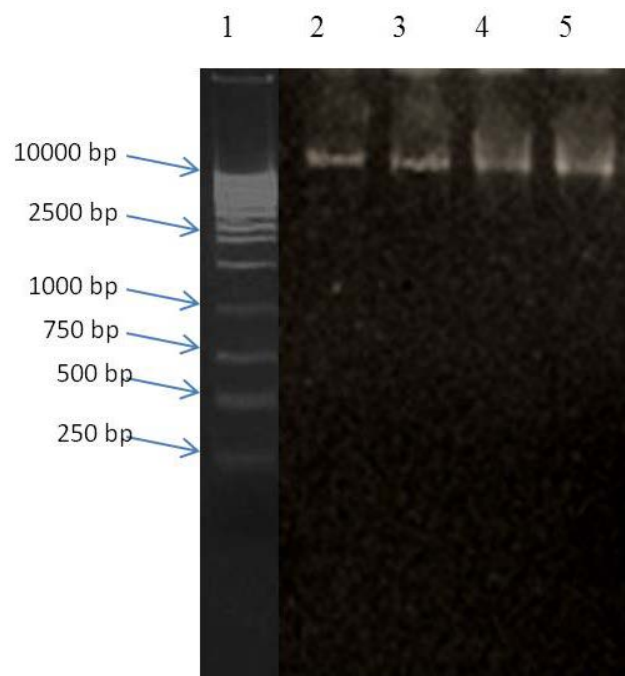


Figura 34.- Electroforesis en geles de agarosa del ADN extraído de los leucocitos tras la incubación durante 24 horas con PMA, bacterias y bacterias+PMA. Líneas: 1, marcador de masa molecular (1Kb DNA ladder Thermo scientific); 2, control de ADN de células no tratadas; 3, ADN de células tratadas con PMA; 4, ADN de células tratadas con la bacteria *T. maritimum*; 5, ADN de células tratadas con PMA y *T. maritimum*.

4.3.- Discusión

Los peces, al igual que otros animales vertebrados, tienen una serie de mecanismos humorales y celulares específicos (inmunidad adquirida) y no específicos (inmunidad innata) que actúan de forma complementaria con el fin de proteger al organismo de agentes patógenos (Ellis, 1999; 2001; Watts y col, 2001). En los teleósteos, la inmunidad innata es de vital importancia ya que se considera que el sistema inmunológico adaptativo está menos desarrollado que en mamíferos. La inmunidad innata incluye las barreras naturales o físicas, tales como el moco y los epitelios, que impiden o dificultan la penetración de los microorganismos, factores solubles que constituyen la defensa humoral inespecífica y varios tipos celulares que constituyen la defensa celular inespecífica (Dalmo y col, 1997; Ellis, 1999, 2001; Heppell y Davis, 2000-, Shailesh y col. 2008).

Entre los mecanismos de defensa humoral inespecífica que actúan en la prevención de la colonización bacteriana y el consecuente daño tisular se incluyen la producción de compuestos antibacterianos, tales como proteínas del complemento activadas por la vía alternativa, proteínas de fase aguda y citoquinas, los factores inhibidores del crecimiento bacteriano y las lisinas, presentes en la sangre, mucus y/o tejidos de los peces (Ellis, 2001; García et al., 2012; Biller 2013). La detección de estos factores protectores en la sangre o

moco de los peces puede ser considerada como una herramienta importante para el análisis del sistema inmunológico innato. Por ello, uno de los objetivos del presente estudio ha sido la estandarización de técnicas para la evaluación de la respuesta inmune humoral y celular no específica en rodaballo y lenguado.

La evaluación de los métodos de análisis de las actividades lisozima (métodos de difusión en placa y espectrofotométrico), bactericida y vía alternativa de complemento (macro y micrométodos) en el suero de rodaballo demostró que todas eran precisas y sensibles, no detectándose diferencias significativas en los niveles de actividad en función de la técnica utilizada.

Los valores de la actividad lisozima, de la vía alternativa del complemento y el índice bactericida observados en las muestras de sangre analizadas en el presente estudio fueron similares a los descritos en peces salmónidos (Grinde 1989, Steinar 2001, Chalmers y col. 2016, Yarahmadi y col., 2016), peces planos (Budiño y col., 2006, Palaksha y col. 2008) y espáridos (Guardiola y col, 2014; Cordero y col., 2016). Además, de las actividades en estudio, sólo la actividad lisozima mostró diferencias significativas entre los sueros de peces no inmunizados e inmunizados.

Los fagocitos, el principal componente de la inmunidad innata celular, participan en las respuestas inflamatorias, pueden fagocitar y matar microorganismos y participan en la presentación del antígeno (Secombes, 1996). Además de los macrófagos, que son los principales fagocitos en los peces, los neutrófilos, las células B y los granulocitos tienen también capacidad fagocítica (Chávez-Pozo y col, 2005, Haugland y col, 2012). En peces se han identificado los tres tipos de granulocitos; neutrófilos, eosinófilos y basófilos, pero su presencia y morfología varían entre especies de peces (Haugland y col, 2012).

El análisis mediante citometría de flujo de las poblaciones celulares en muestras de sangre, bazo y riñón de rodaballo y lenguado, realizado en el presente estudio, ha permitido demostrar la existencia de tres tipos celulares compatibles con linfocitos, monocitos y granulocitos, en base a su talla y complejidad y en concordancia con las poblaciones celulares descritas en peces salmónidos por otros investigadores (Morgan y col., 1993; Secombes, 1996; Bowden y col., 1997, Pettersen y col., 2000). Además, se han observado diferencias cuantitativas con respecto al tipo celular, dependiendo del tejido de procedencia y de la especie de pez. Así, mientras en las muestras de sangre y bazo de rodaballo y lenguado, los linfocitos constituyen la población predominante, en las muestras de riñón la proporción celular varía en función de la especie de pez. Estos resultados concuerdan con los descritos en otras especies de peces (Hibiya, 1994, Esteban y col., 1998, Chilmoneczyk y Monge, 1999, Pettersen y col., 2000; Crippen y col., 2001, Haugland y col, 2012).

Con el fin de desarrollar una técnica rápida y no cruenta para evaluar las poblaciones de leucocitos en sangre periférica de rodaballo y lenguado, se compararon el método de centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll con un método basado en la lisis hipotónica, no observándose grandes diferencias en el porcentaje de células de cada subpoblación en el caso del rodaballo, y produciéndose una reducción de la población de granulocitos en la sangre de lenguado extraída con Ficoll. Inoue y col. (2002) también observaron la existencia de variaciones en la fórmula leucocitaria en función del método de extracción de los leucocitos utilizado. Además, en concordancia con los resultados obtenidos en lenguado en el presente estudio, estos investigadores demostraron que el método de centrifugación en gradiente de densidad con Percoll produce una marcada reducción de basófilos en sangre de carpa.

La fagocitosis es un mecanismo esencial del sistema inmunológico innato y constituye la primera línea de defensa contra patógenos invasores en todos los organismos eucarióticos.

El desarrollo de métodos fiables que permitan cuantificar la fagocitosis y la identificación de las células implicadas en dicho proceso es, por tanto, de gran interés. Por ello, en el presente estudio se han optimizado las condiciones para el análisis de la actividad fagocítica y respiratoria de los fagocitos mediante citometría de flujo.

El ensayo de fagocitosis descrito en este estudio es una modificación del procedimiento basado en el uso de citometría de flujo, descrito por Esteban y col (1998) para leucocitos de dorada. Este método tiene la ventaja de permitir valorar un número mayor de células que el habitualmente valorado por métodos microscópicos (100-250 células), mejorando la precisión del ensayo (Esteban y col, 1998). Con el fin de adaptar este procedimiento al estudio de la actividad fagocítica de los leucocitos de rodaballo y lenguado, se definieron las condiciones y concentraciones para el adecuado marcaje de las células bacterianas con FICT [marcaje homogéneo del 80% de las bacterias usando FICT (100µg/ml) e incubación a 4°C durante 12h] y para su conservación durante períodos de al menos seis meses (congelación a -80°C, protegidas de la luz), se estableció un sistema para la diferenciación de células intra y extracelulares basado en el uso de una solución al 2% de azul tripán que permitía la eliminación de la fluorescencia externa (reducción hasta el 4,2%) debida a las bacterias no ingeridas y se estableció que la relación óptima de leucocitos:células bacterianas para estimular la fagocitosis en leucocitos de rodaballo y lenguado era 1:100 (leucocitos:bacteria). Estos resultados difieren de lo descrito por Esteban y col. (1998) en lo que se refiere a la relación leucocitos:bacteria (relación 1:10) y a la concentración de azul tripán necesaria para la eliminación de la fluorescencia externa (solución al 0,4% de azul tripán). Estas diferencias pueden deberse al uso de diferentes especies bacterianas y condiciones para el marcaje así como a las diferentes especies de peces a partir de las cuales se obtuvieron los leucocitos en ambos estudios.

Una vez que los microorganismos patógenos han sido fagocitados, los fagocitos utilizan distintos procesos para eliminarlos entre los que se encuentra el estallido respiratorio. Durante el estallido respiratorio los fagocitos producen y liberan especies reactivas de oxígeno implicadas en la respuesta inflamatoria y destrucción del patógeno que se encuentra internalizado. *In vivo*, las células fagocíticas son activadas por una serie de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) así como por componentes humores. *In vitro*, los fagocitos son activados por varios estimulantes que se unen a sus receptores de reconocimiento de patrones o por activadores solubles e independientes del receptor como el PMA (Castro y col., 1999; Cook y col., 2001; Cousó y col., 2001; Lee y col., 2004; Budiño y col., 2006; Chettri y col., 2010; Haugland y col., 2012).

En el presente estudio la actividad estallido respiratorio de los leucocitos renales de rodaballo y lenguado, activados con bacterias o PMA, fue evaluado mediante citometría de flujo utilizando como sonda 123-DHR. Los resultados obtenidos demuestran que los leucocitos estimulados con PMA muestran su mayor actividad a los 45 (rodaballo) y 60 (lenguado) minutos. Los efectos inmunoestimulantes del PMA y otros activadores como el zymosan y β-glucano han sido estudiados previamente en teleósteos (Cook y col., 2001; Lee y col., 2004; Chettri y col., 2010). En estos estudios también se observó que la incubación de los leucocitos con los activadores por períodos de tiempo prolongados (superior a 4h) producía un descenso de la actividad respiratoria. El agotamiento de la capacidad de la célula para producir radicales debido a la incubación durante varias horas con los agentes estimulantes podrían explicar estos resultados.

De los estimulantes utilizados, el PMA fue el que indujo *in vitro* una mayor respuesta en los leucocitos de ambas especies de peces, con índices de estimulación (IE entre 1,05 y 17,70 dependiendo del tejido de procedencia de los leucocitos) similares a los descritos en

trucha arcoiris (Chilmonczyk y Monge, 1999), carpa (Stosik y col., 2002), salmón y bacalao (Kalgraff y col., 2011), así como en ciclópteros (Haugland y col. 2012). En contraste, se observó una reducción en la respuesta cuando se empleaban bacterias (*T. maritimum*) o una mezcla de bacterias y PMA como estimulante. Este efecto podría ser debido a que la activación de fagocitos e inducción del estallido respiratorio producida por el PMA está mediada por receptores citoplasmáticos, mientras que la activación mediada por inmunocomplejos, componentes del complemento, citoquinas y por bacterias, es dependiente de los receptores de membrana (Cascales, 2005; Hurst, 1987). Otros investigadores (Castro y col, 1999; Figueras y col., 1997) han indicado que los macrófagos tienen un límite máximo de respuesta, independientemente de la cantidad de estimulante utilizado. Alternativamente, los resultados obtenidos en el presente estudio con células viables de *T. maritimum* o la mezcla de PMA y bacteria sugieren que la inhibición del estallido respiratorio podría constituir un mecanismo de virulencia para este patógeno. En estudios previos se ha descrito que la inhibición del estallido respiratorio de leucocitos es un mecanismo de virulencia de algunos patógenos de mamíferos (McCaffrey y Allen, 2006) y peces (Boesen y col., 2001, Sepulcre y col., 2007). Esta inhibición permitiría que la bacteria sobreviva dentro de los fagocitos y finalmente induzca su muerte. La capacidad para sobrevivir y replicarse en los macrófagos y de producir inmunosupresión por inducción de la apoptosis de leucocitos ha sido descrita en patógenos de peces como *Edwardsiella tarda* (Srinivasa Rao y col., 2001; Ishibe y col, 2008 y 2009; Pirarat y col., 2007) y *V. anguillarum* (Boesen y col., 2001 y Sepulcre y col., 2007), así como en *Mycobacterium marinum*, un conocido patógeno de peces y seres humanos (El-Etr y col., 2001).

Estudios previos han demostrado que los leucocitos de diferentes especies de peces tienen actividad citotóxica mediada por células citotóxicas, natural killer y linfocitos T citotóxicos que actúan contra células alteradas y/o extrañas. La mayoría de estos trabajos se basan en experimentos funcionales (Fischer y col., 2006; Nakanishi y col., 2011), basados en el uso de células marcadas radiactivamente (Tafalla y col., 2001) o en la detección de lactato deshidrogenasa, una enzima citosólica estable liberada al medio tras la lisis celular (Chaves-Pozo, 2017).

En el presente estudio se han optimizado las condiciones para el estudio de la actividad citotóxica de los leucocitos de rodaballo y lenguado mediante citometría de flujo, utilizando como células diana, células de línea continua de peces (EPC) y de linfoma humano (CCL-214). Los resultados más estables se obtuvieron utilizando las células CCL-214 (linfoma humano) como células diana, posiblemente por la facilidad de conseguir un marcaje homogéneo de las células con DIO, una ratio (20:1) y una temperatura óptima de 16°C para los leucocitos de rodaballo y de 18°C para los leucocitos de lenguado. Con los leucocitos de ambas especies de peces, se obtuvieron porcentajes de actividad citotóxica ligeramente superiores (24 y 31% para leucocitos de lenguado y rodaballo, respectivamente) a los descritos en trucha arcoiris (Chilmonczyk y Monge, 1999; Iwanowicz y col., 2004), dorada y lubina (Chaves-Pozo y col, 2017) y rodaballo (Tafalla y col., 2001) e inferiores a los observados en dorada por Cuesta y col (2002). Estas discrepancias pueden ser debidas al diferente origen de las células efectoras (leucocitos trucha, dorada, lubina, rodaballo y lenguado) y/o dianas (CCL-214, EPC, SAF-1, SSN-1 E-11, DLB-1) utilizadas en los distintos estudios.

La apoptosis es un proceso de gran importancia tanto en la regulación del número de linfocitos como en la eliminación de linfocitos autorreactivos. Durante distintos procesos infecciosos la apoptosis de linfocitos se convierte muchas veces en una forma de control que posee el pez con el objetivo de eliminar linfocitos que albergan al patógeno y/o mantener la

homeostasis del sistema inmune. Además, según se ha descrito (Park, 2003), la fagocitosis de bacterias no solo induce el estallido respiratorio, sino que también puede iniciar un proceso apoptótico en las células fagocíticas.

En nuestro estudio hemos comprobado que la estimulación con PMA no induce apoptosis en los leucocitos, en cambio sí se observa un aumento de células preapoptóticas y apoptóticas cuando se incuban los leucocitos con la bacteria *T. maritimum* o cuando son sometidos a la acción conjunta del PMA y *T. maritimum*. Estos resultados, pueden ayudar a explicar el descenso del estallido respiratorio observado cuando las células son estimuladas con bacterias con respecto a los estimulados sólo con PMA o una mezcla de PMA y bacterias, anteriormente comentados. La inhibición de la actividad respiratoria de leucocitos se ha descrito como un mecanismo de virulencia de algunos patógenos (bacterias, virus y parásitos) de mamíferos (McCaffrey y Allen, 2006) y peces (Boesen et al., 2001; Sepulcre y col., 2007; Nagata, 1997). Esta inhibición permite que las bacterias sobrevivan dentro de los fagocitos y eventualmente induzcan su muerte por activación de las caspasas relacionadas con la apoptosis (Hacker y col., 2002; Vale y col., 2003, 2005; Reis y col., 2007a, b).

La condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN son características clave de las células apoptóticas que son finalmente eliminadas por los fagocitos. La ADN-asa activada por las caspasas, es liberada en el citosol de la mitocondria entrando en el núcleo y fragmentando el ADN (Elmore, 2007). De ahí, la importancia del estudio del patrón de fragmentación del ADN en una célula apoptótica, ya que en el caso de senescencia programada deben observarse bandas de fragmentación de tamaño aproximado de 180 a 200 pares de bases (Bortner y col., 1995; Zhivotovsky y col., 2001; Elmore, 2007), mientras que en la necrosis el patrón de degradación no tiene especificidad en los tamaños de los fragmentos. En el presente estudio los resultados obtenidos indican que 24 horas post-incubación no se observan bandas de degradación de ADN en ninguno de los casos, lo que lleva a pensar que no existe apoptosis o bien que al ser una técnica cuantitativa no exista el suficiente número de células apoptóticas (al menos un millón) para poder detectar las bandas de fragmentación del ADN (Elmore, 2007; Huerta y col., 2007). Sin embargo, la pérdida de potencial de la membrana mitocondrial y el incremento de los niveles de caspasas efectoras 3 y 7 tras la incubación de los leucocitos de rodaballo con la bacteria *T. maritimum* sugieren el inicio de un proceso apoptótico, detectado como un incremento de las células preapoptóticas, que no habrían sufrido aún la fragmentación del ADN, lo que explicaría la ausencia de patrones de fragmentación.

5.-EFECTO DE LA INFECCIÓN SOBRE LA RESPUESTA INMUNE NO ESPECÍFICA

5.1.- Materiales y Métodos

5.1.1.- Infecciones experimentales

En este capítulo se evaluó el efecto de la infección bacteriana sobre el hematocrito, poblaciones linfocitarias y algunos parámetros del sistema inmunitario del rodaballo. Con este fin se utilizaron rodaballos sanos con un peso medio de $80,1 \pm 15,7$ g. El centro y proyecto de experimentación autorizados, persona responsable de la realización de los ensayos, normativa vigente en la materia, así como las condiciones experimentales y de mantenimiento de los peces fueron las descritas en el apartado 3.1.3.

Antes de la infección experimental, se tomaron muestras de sangre de los peces del lote que se iba a utilizar en los ensayos. La infección experimental se realizó siguiendo básicamente la metodología descrita en el apartado 3.1.4. Para ello, los peces se anestesiaron (MS222, 100 mg/ml) y se inyectaron intracelómicamente con 0,1 ml de suspensiones de la cepa bacteriana LL018.3.8 de *T. maritimum* ajustadas a una concentración de 10^{10} UFC/ml (Dosis alta, DA) y de 10^9 UFC/ml (Dosis baja, DB). Se utilizaron 100 peces por dosis y se incluyeron como control un número igual de peces inoculados con solución salina estéril. Tras la infección experimental, se realizaron muestreos al azar de los grupos de peces control e infectados, según el protocolo de muestreo que se muestra en la Tabla 29. En cada muestreo, los peces se anestesiaron (MS222), se pesaron y midieron y se extrajo la sangre para los estudios hematológicos e inmunológicos. Antes de proceder a la necropsia para la toma de muestras de riñón cefálico para los análisis microbiológicos y moleculares (PCR) y el estudio de la respuesta inmune celular, los peces se sacrificaron por sobredosis del anestésico,

Tabla 23- Protocolo de muestreo y número de peces muestreados en cada grupo.

Muestreos (horas)	Nº Peces infectados con <i>T. maritimum</i> Dosis alta (DA)	Nº Peces infectados con <i>T. maritimum</i> Dosis Baja (DB)	Peces control
0	-	-	6
3	6	6	6
6	6	6	6
24	6	6	6
48	6	6	6
72	6	6	6
96	6	6	6
168	6	6	6

5.1.2.-Efecto de la infección sobre el hematocrito y poblaciones de leucocitos

5.1.2.1.- Obtención y conservación de la sangre y el suero

La sangre se obtuvo por punción a través de la vena caudal utilizando jeringuillas estériles con heparina (sangre para determinación del hematocrito) o sin heparinizar (obtención de suero). La sangre con heparina se utilizó inmediatamente. La sangre no heparinizada se dejó coagular a temperatura ambiente durante 2 horas y, tras 12 h a 4°C, se separó el suero de los restos sólidos por centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El suero se distribuyó a razón de 1 ml por tubo y se mantuvo congelado a -30°C hasta su uso

5.1.2.2.- Determinación del hematocrito

El hematocrito mide el porcentaje del volumen sanguíneo total que está compuesto por eritrocitos. Para la realización del ensayo, se llenaron por capilaridad los tubos de micro-hematocrito con la sangre heparinizada obtenida a partir de los peces control e infectados experimentalmente, se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 min y se leyó el resultado con un lector de hematocrito. El resultado se expresó en porcentaje.

5.1.2.3.- Efecto de la infección sobre las poblaciones leucocitarias

Para determinar el efecto de la infección bacteriana sobre la composición de la población de leucocitos se obtuvieron leucocitos de riñón de rodaballos control e infectados con la bacteria *T. maritimum* transcurridas 0, 2, 6, 48 y 72 horas desde el inicio del ensayo de infección experimental. Se utilizaron muestras de los peces infectados con la dosis alta (10^{10} UFC/ml). Los procedimientos utilizados para la obtención de leucocitos y estudio de las poblaciones mediante citometría de flujo fueron los descritos en los apartados 4.1.3.1 y 4.1.3.2, respectivamente.

5.1.3.- Efecto de la infección sobre la respuesta inmune no específica

5.1.3.1.- Efecto de la infección sobre la respuesta inmune humoral no específica

El efecto de la infección experimental con la bacteria *T. maritimum* sobre la respuesta inmune humoral no específica del rodaballo, se evaluó según la metodología descrita en los apartados 4.1.2.2 (actividad lisozima), 4.1.2.3 (actividad bactericida) y 4.1.2.4 (vía alternativa del complemento), utilizando los sueros obtenidos a partir de los peces control e infectados experimentalmente con las dos dosis (DA y DB) de la bacteria *T. maritimum* (apartado 5.1.1) desde las 3 a las 72h post-infección.

5.1.3.2.- Efecto de la infección sobre la actividad respiratoria de leucocitos

La respuesta inmune celular del rodaballo frente a la infección experimental con *T. maritimum* (utilizando DA y DB de bacterias), se evaluó en base a la actividad estallido respiratorio de los leucocitos de riñón cefálico, siguiendo la metodología optimizada en el apartado 4.2.2.3. Para este estudio se utilizaron muestras de riñón cefálico de peces control e infectados con *T. maritimum*, obtenidas durante todo el período experimental (Tabla 29).

5.1.4.- Análisis estadístico

Para cada uno de los experimentos mostrados se utilizaron grupos de 6 peces. Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar (EE) de los datos analizados y se compararon usando un ANOVA de una vía y el test de Bonferroni, utilizando el modelo de U de Mann-Whitney para comprobar la heterogeneidad de dos muestras ordinales. Los análisis se realizaron utilizando el programa IBM SPSS Statistics 22 y se consideró un nivel de significación menor o igual a 0,05 ($p \leq 0,05$).

5.2.- Resultados

5.2.1.- Infección experimental

Los resultados del ensayo de patogenicidad con la cepa LL01 8.3.8 de *Tenacibaculum maritimum* demostraron que el aislado era virulento para rodaballos y producían mortalidad superior al 50% durante las primeras 48h post-infección, cuando se inoculaba por vía intraperitoneal en dosis altas (DA) (10^{10} UFC/ml) mientras que a dosis bajas (DB) (10^9 UFC/ml) no se observaron mortalidades (Tabla 30). Los peces inoculados con DA mostraron signos clínicos de enfermedad como aparición de áreas de decoloración y hemorragias en boca. Los estudios microbiológicos corroboraron que los peces morían como consecuencia de la bacteria inoculada. La bacteria *T. maritimum* se recuperó en los medios FMM y AM a partir de órganos internos de todos los peces muertos y/o moribundos analizados durante las primeras 48h post-infección. En cambi, no se consiguió el aislamiento de la bacteria a partir de los peces infectados supervivientes a partir de las 72h postinfección ni a partir de los peces control. La identificación de los aislados se confirmó mediante PCR. A lo largo del experimento no se detectó crecimiento en los medios TCBS ni TSA-1 tras la siembra de muestras de órganos internos de los peces infectados o control.

Tabla 24.- Recuperación de *Tenacibaculum maritimum* a partir de peces infectados experimentalmente.

Peces	Tiempo post-infección	TSA-1	AM/FMM	TCBS
Control	0h	-	-	-
	3h	-	-	-
	6h	-	-	-
	24h	-	-	-
	48h	-	-	-
Inoculados con dosis baja	72h	-	-	-
	3h	-	-	-
	6h	-	-	-
	24h	-	-	-
	48h	-	-	-
Inoculados con dosis alta	72h	-	-	-
	3h	-	+	-
	6h	-	+	-
	24h	-	+	-
	48h	-	+	-
	72h	-	-	-

"+", aislamiento de la bacteria a partir de órganos internos; "-", la bacteria no se aísla.

5.2.2.- Efecto de la infección sobre parámetros hematológicos

El principal objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la infección con *T. maritimum* sobre el hematocrito y poblaciones de leucocitos con el fin de establecer marcadores de la infección.

5.2.2.1.- Hematocrito

Los resultados del análisis del hematocrito en sangre de peces control e infectados con *T. maritimum*, determinados durante el período de duración del ensayo (0 a 168h), se muestra en la Figura 35. Los valores hematocrito oscilaron entre 12,5 y 20,3% en peces inoculados con DB, 13 y 16,7% en peces inoculados con DA y 13,7 y 17% para el grupo control (excepto al inicio del ensayo (0h) en el que se obtuvieron valores de 24,2%). No se detectaron diferencias significativas (ANOVA, $p < 0,05$) en el valor hematocrito entre peces infectados y peces control a lo largo del período analizado (168h).

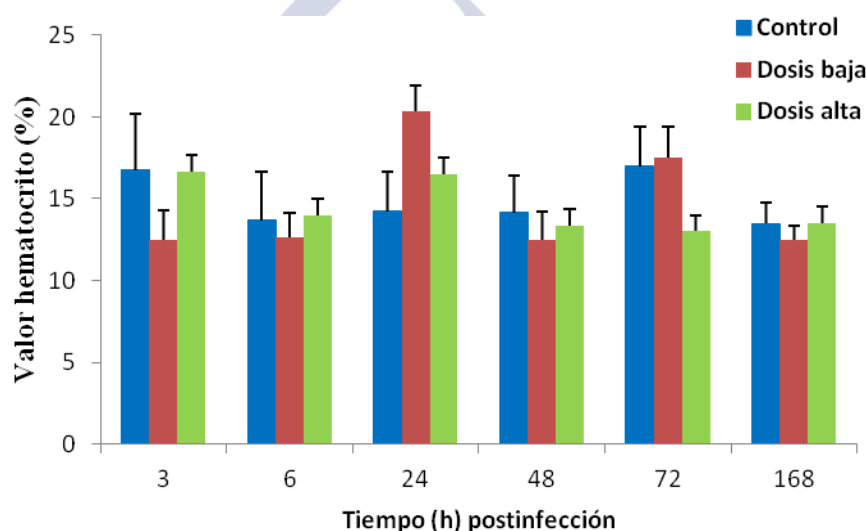


Figura 35.- Valores de hematocrito en peces control e infectados experimentalmente con la cepa LL01 8.3.8 de *T. maritimum*.

5.2.2.2.- Estudio de las poblaciones celulares en riñón

Se ha evaluado el efecto inmunoregulador de la infección por *T. maritimum* en base al análisis comparativo de la composición de los leucocitos del riñón cefálico en muestras de peces control e infectados experimentalmente (DA, 10^{10} UFC/ml). Para la asignación de cada subpoblación a un tipo celular se tuvo en cuenta la relación FSC/SSC descritas por Stosik (2001): i) bajo FSC/bajo SSC (compatible con linfocitos), ii) medio FSC/bajo SSC (compatible con monocitos) y iii) alto FSC/alto SSC (compatible con granulocitos).

Los resultados del análisis de la evolución de las poblaciones celulares en muestras del riñón anterior de peces control e infectados experimentalmente con *T. maritimum* se muestran en la Figura 36. Durante las primeras 48h post-infección se observó una leve reducción en la población de granulocitos renales en los peces infectados, observándose un incremento significativo ($p < 0,05$) del porcentaje de estas células a partir de las 168 h post-infección.

(Figura 36A). Además, el porcentaje de granulocitos renales a las 168h post-infección era significativamente mayor a los observados a lo largo del experimento (3, 6, 24, 48 y 72h post-infección) (Figura 36A). En el caso de la población de monocitos (Figura 36B), no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células respecto a lo observado en el grupo control. El porcentaje de linfocitos (Figura 36C) aumentó ligeramente en los peces infectados con respecto al observado en los peces control durante las primeras 48h post-infección, observándose posteriormente un descenso no significativo ($p < 0,05$). En los peces infectados se observaron diferencias significativas en los porcentajes de monocitos y linfocitos entre las muestras tomadas al inicio y fin del experimento.

5.2.3.- Efecto de la infección sobre la respuesta inmunitaria no específica

5.2.3.1.- Respuesta inmune humoral no específica en rodaballos infectados

Con el fin de establecer marcadores de infección se han estudiado algunos parámetros del sistema inmune innato (actividad lisozima, bactericida y vía alternativa del complemento) en rodaballos infectados experimentalmente con *T. maritimum* y en peces control.

La actividad lisozima de los sueros de peces infectados con la dosis baja (DB) de *T. maritimum* (Figura 37), se incrementó de forma no significativa ($p < 0,05$) con respecto a los valores observados en el suero de peces control a las tres primeras horas post-infección y retornó a valores similares a los observados en peces no infectados a partir de las 6h post-infección (Figura 37). En contraste, en el suero de peces infectados con la dosis alta (DA) de *T. maritimum* se detectó la existencia de dos pulsos o incrementos de actividad lisozima (a las 6h y 48h post-infección) con respecto a los valores observados en el grupo control (Figura 37), siendo estas diferencias significativas sólo a las 48h. En este estudio también se observó efecto del factor tiempo post-infección ($p < 0,05$) con ambas dosis bacterianas (Figura 37).

El análisis de los sueros de peces infectados experimentalmente con *T. maritimum* (Figura 38) demostró que su actividad bactericida, expresada como índice bactericida, se incrementaba con respecto a los valores observados en peces control a partir de las tres primeras horas post-infección y retornaba a valores similares o inferiores a los observados en peces no infectados a partir de las 6h sin observarse un efecto de la dosis inoculada pero sí del factor tiempo post-infección en peces infectados con las dos dosis bacterianas utilizadas ($p < 0,05$).

El análisis de los sueros de peces infectados experimentalmente con *T. maritimum* (Figura 39) demostró que la actividad de la vía alternativa del complemento del suero de los peces infectados, expresada como CH_{50} , se reduce ligeramente durante las primeras seis horas post-infección mostrando valores similares o ligeramente superiores a los observados en peces no infectados a partir de las 24 horas post-infección. No se han observado diferencias significativas en los niveles de complemento del suero entre peces infectados y control ni se detectó influencia del factor tiempo o de la dosis bacteriana utilizada en el reto infeccioso.

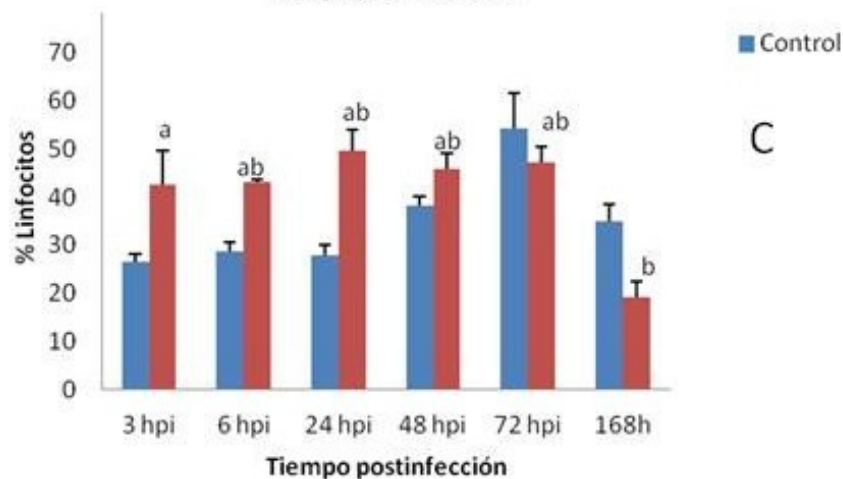
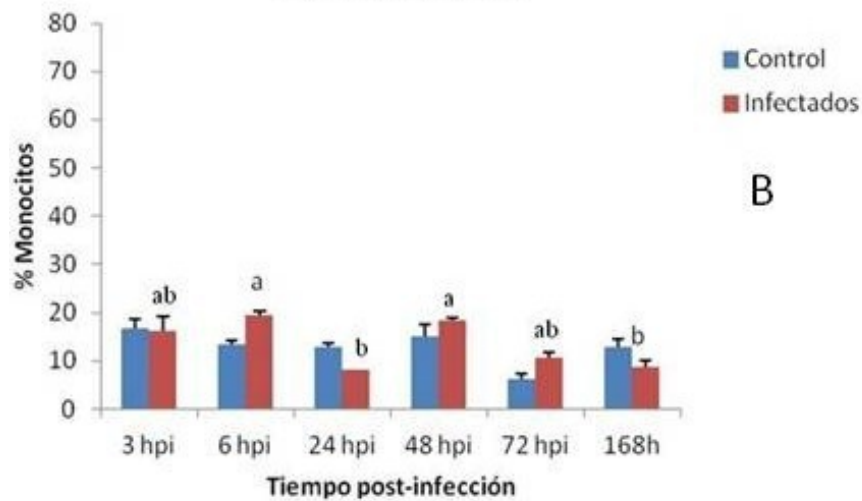
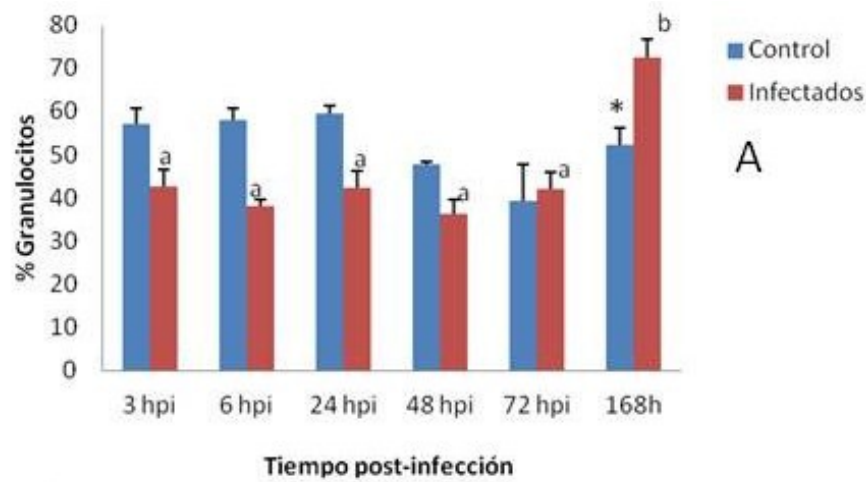


Figura 36.- Evolución temporal de las poblaciones de granulocitos (A), monocitos (B) y linfocitos (C) de riñón anterior de rodaballos tras la infección con *T.maritimum*. Las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre peces control e infectados se indican con asterisco y entre los grupos de peces infectados a lo largo del período de experimentación se indican con letras diferentes, las letras en común indican que no existe diferencias significativas.

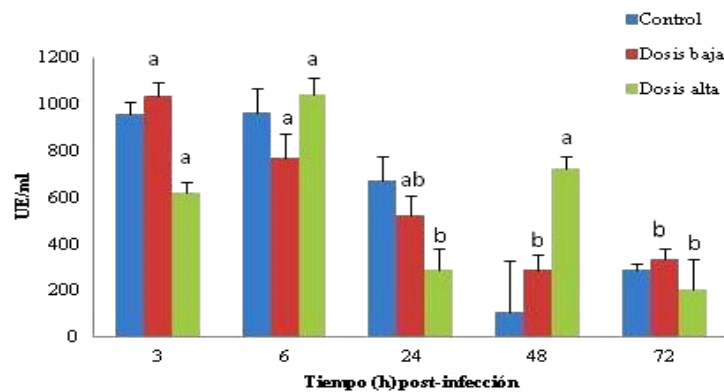


Figura 37.- Actividad lisozima en peces sanos e infectados experimentalmente con *T. maritimum*. Las diferencias significativas ($p<0,05$) entre peces control e infectados se indican con asterisco y entre los grupos de peces infectados a lo largo del periodo de experimentación se indican con letras diferentes, las letras en común indican que no existe diferencias significativas.

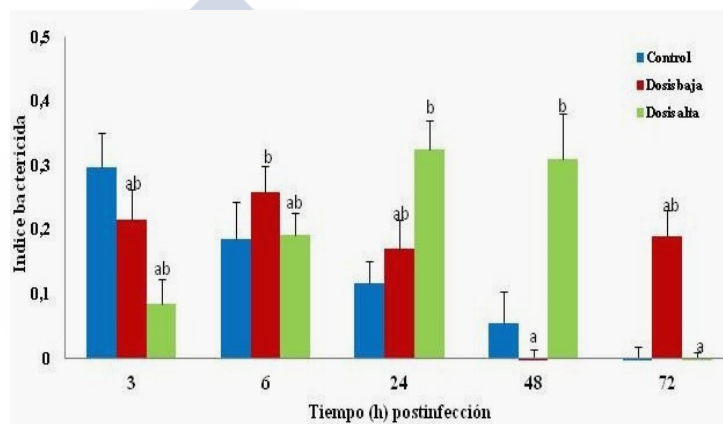


Figura 38.- Actividad bactericida en peces sanos e infectados experimentalmente con *T. maritimum*. $IB=A_{620}$ de la muestra tratada con suero/ A_{620} de la muestra no tratada = control negativo). Las diferencias significativas ($p<0,05$) entre peces control e infectados se indican con asterisco y entre los grupos de peces infectados a lo largo del periodo de experimentación se indican con letras diferentes, las letras en común indican que no existe diferencias significativas.

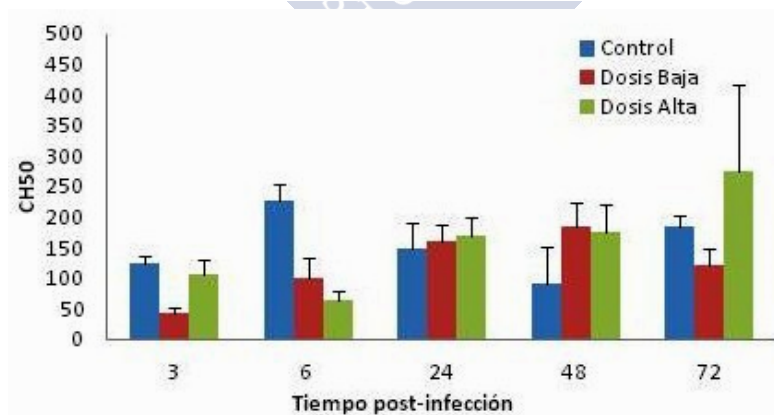


Figura 39.- Actividad complemento (vía alternativa) en peces sanos e infectados experimentalmente con *T. maritimum*. Se calculó como CH50, dilución del suero que causa un 50 % de hemólisis en una suspensión de eritrocitos. Las diferencias significativas ($p<0,05$) entre peces control e infectados se indican con asterisco y entre los grupos de peces infectados a lo largo del periodo de experimentación se indican con letras diferentes, las letras en común indican que no existe diferencias significativas.

5.2.3.2.- Estudio de la respuesta inmune celular no específica

El estudio de la respuesta inmunológica innata es de utilidad para determinar el estado de salud y el efecto de diferentes compuestos (vacunas, adyuvantes, antimicrobianos...) en los peces. En este apartado se ha evaluado la actividad estallido respiratorio de los macrófagos del riñón cefálico de rodaballos infectados (DA y DB de la bacteria) y de peces control como marcador de la respuesta inmune celular no específica frente a la infección por *T. maritimum*.

Los macrófagos de peces infectados con las DB y DA de *T. maritimum* mostraron una actividad respiratoria, expresada como índice de estimulación (IE), similar o inferior a la de los peces control inyectados con solución salina estéril (Figuras 40 y 41). Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente al infectar *in vitro* los granulocitos de rodaballo y lenguado con células viables de *T. maritimum* (apartado 4.2.2.3).

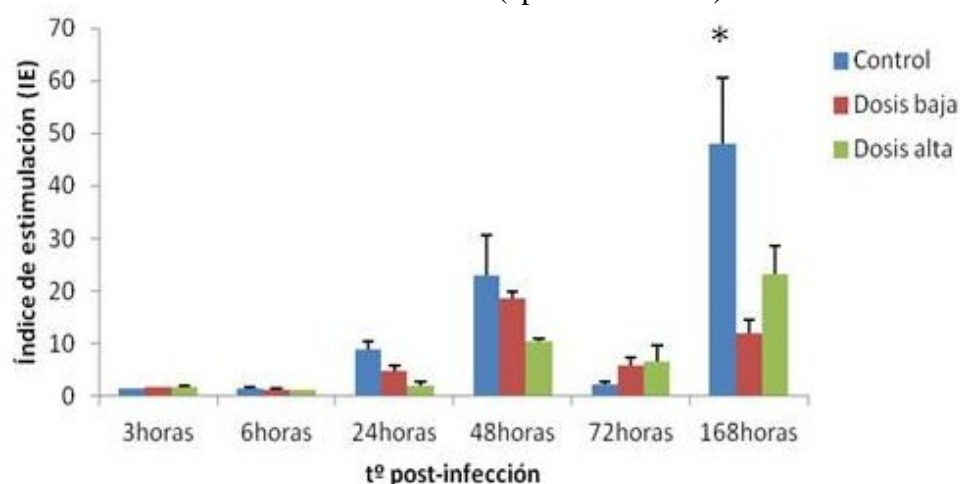


Figura 40.- Actividad respiratoria (IE) de los macrófagos de riñón anterior de rodaballos control e infectados experimentalmente. IE, Índice de estimulación = media geométrica de la intensidad de fluorescencia en leucocitos estimulados con PMA/media geométrica de la intensidad de fluorescencia en muestras no estimuladas. Las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre peces control e infectados o entre DA y DB se indican con asterisco y entre los grupos de peces infectados a lo largo del período de experimentación se indican con letras diferentes, las letras en común indican que no existe diferencias significativas.

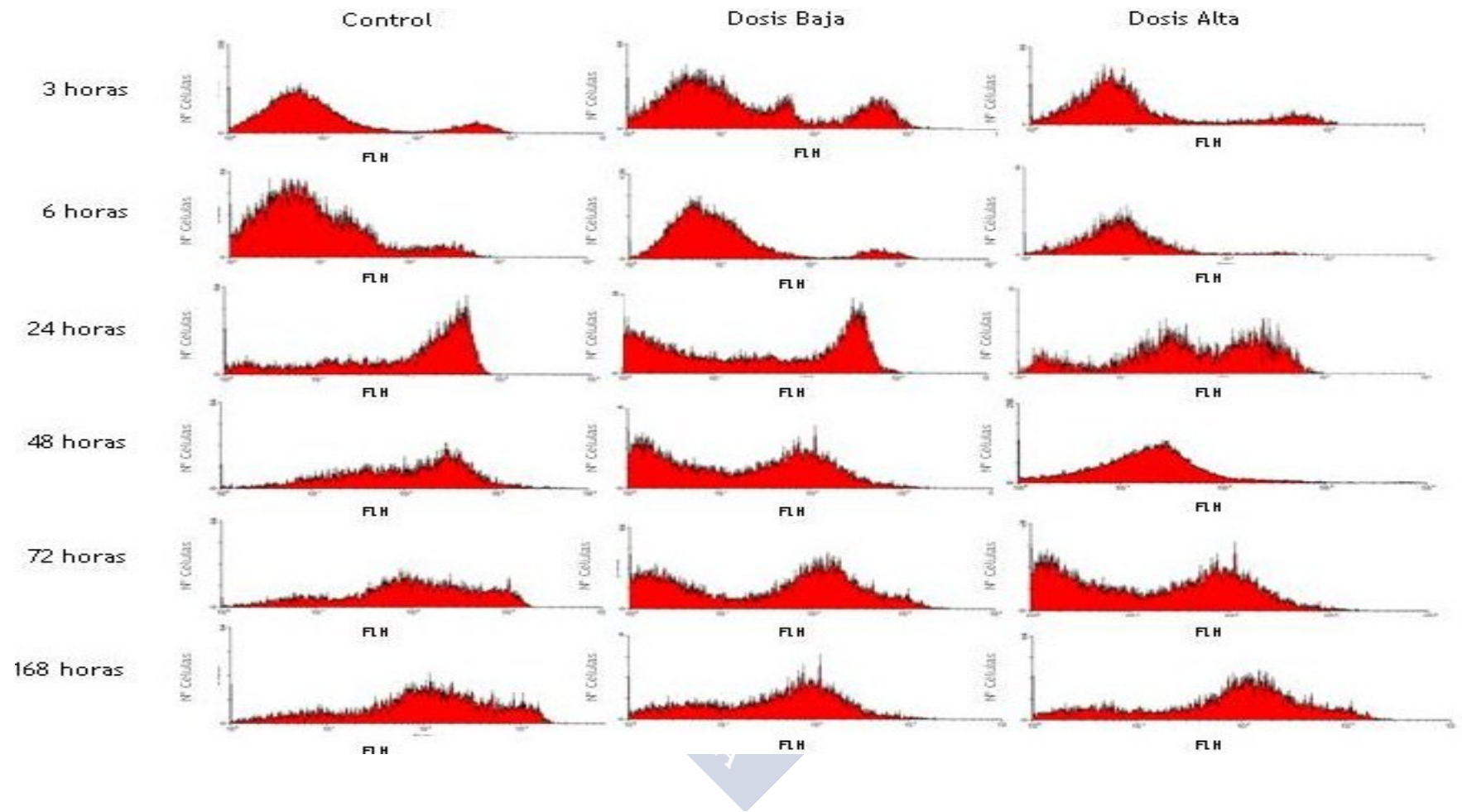


Figura 41.- Histogramas que muestran la evolución del estallido respiratorio en peces infectados con dosis alta y en peces control a las 3 horas, 6 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas post-infección.

5.3.- Discusión

La tenacibaculosis marina causada por la bacteria filamentosa *T. maritimum*, produce importantes mortalidades en rodaballo y lenguado cultivado. Los peces afectados por la enfermedad muestran signos clínicos característicos como erosiones en aletas y boca, hemorragias en piel, degradación de los tejidos interradales de las aletas, así como la presencia de úlceras en la piel en diferentes zonas del cuerpo (Failde 2013, 2014).

El objetivo de este estudio fue valorar el efecto de la infección por *T. maritimum* sobre el hematocrito y algunos parámetros de la respuesta inmune innata humoral y celular con el fin de establecer marcadores de infección. Para ello, se evaluaron algunos parámetros hematológicos y del sistema inmune innato humoral y celular.

El análisis de parámetros hematológicos constituye una herramienta importante para el diagnóstico y puede revelar el estado de salud de los peces (Blaxhall, 1972; Rehulka, 2002; Martins y col. 2004). Estudios previos han demostrado que, al igual que ocurre en animales homeotermos, los parámetros hematológicos de los peces pueden variar como consecuencia del estrés, tratamientos e infecciones (Rehulka, 2002). Aunque en el presente estudio no se observaron diferencias significativas en el hematocrito entre peces infectados y control, los valores hematocrito de la sangre de los peces infectados fueron siempre inferiores a los de los peces control. En estudios previos nuestro grupo ha obtenido resultados similares utilizando ejemplares de rodaballo de menor tamaño (Failde y col., 2014). Estos resultados concuerdan con los descritos para tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) infectada con *Enterococcus* sp. (Martins y col., 2008) y *Streptococcus iniae* (Chen y col., 2004), salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) infectado con *Vibrio anguillarum* (Harbell y col., 1979), carpa dorada (*Carassius aurata*) y carpa común (*Cyprinus carpio*) infectadas con *Aeromonas* spp. (Brenden and Huizinga, 1986; Harikrishnan y col., 2003), en los que la reducción del hematocrito se asocia con la anemia producida por las hemorragias o por la destrucción de eritrocitos debido a la acción de las hemolisinas bacterianas.

En cuanto a las poblaciones celulares, se han descrito cambios en la distribución de leucocitos después de la infección con patógenos o tras la vacunación de los peces (Afonso y col, 1998; Ellis, 200; Chin y col. en 2005). Los granulocitos generalmente se consideran células efectoras de la respuesta inmune innata (Secombes, 1994), mientras que los monocitos y los linfocitos que también funcionan de forma no específica son importantes como células accesorias para iniciar la respuesta inmune adaptativa (Clem y col., 1985; Van Muiswinkel 1995; Pathiratne y Rajapakshe, 1998). En el presente estudio se han observado cambios en la proporción de granulocitos y linfocitos en riñón cefálico tras la infección con *T. maritimum*, lo que sugiere que la bacteria es capaz de provocar una activación de la inmunidad innata. La reducción inicial de los granulocitos renales podría deberse a la liberación de estos al torrente sanguíneo para su desplazamiento al sitio de inflamación. Dado que el sitio principal de eliminación de patógenos bacterianos suele ser los órganos y tejidos y no la sangre de los peces (Afonso y col, 1998; Ellis, 200; Chin y col. en 2005), el incremento del porcentaje de granulocitos a partir de las 168 h post-infección sugiere que los granulocitos migran de la sangre a los tejidos para protegerlos.

La lisozima es una enzima producida por leucocitos, especialmente monocitos, macrófagos y neutrófilos. La lisozima es una molécula de defensa del sistema inmunológico innato, que desempeña un importante papel en la protección contra la invasión microbiana gracias a su actividad lítica contra las bacterias (Saurabh y Sahoo, 2008). En mamíferos, la

deficiencia en lisozima se asocia a un aumento de la propensión a las infecciones. En el presente estudio se observó que la actividad lisozima de los sueros de peces infectados con la dosis baja (DB) de *T. maritimum*, se incrementaba con respecto a los valores observados en el suero de peces control en las primeras horas post-infección y retornaba a valores similares a los observados en peces no infectados a partir de las 6h post-infección. La existencia de un único incremento en los peces infectados con la DB podría indicar que la actividad lisozima ha sido capaz de controlar la infección, hecho que concuerda con la ausencia de mortalidad en este grupo de peces, así como con la incapacidad para recuperar la bacteria o para detectarla mediante PCR a partir de órganos internos. En los sueros de peces infectados con la dosis alta (DA) de *T. maritimum* se detectó la existencia de dos incrementos de actividad lisozima (a las 6h y 48h post-infección) con respecto a los valores observados en el grupo control, debido posiblemente a la incapacidad de los granulocitos de controlar la infección con el primer incremento. La imposibilidad de recuperar *T. maritimum* de los peces supervivientes a partir de las 72h post-infección confirman la importancia de la lisozima en el control de las infecciones causada por esta bacteria. Estos resultados concuerdan con estudios previos en los cuales la administración de bacterinas, e inmunostimulantes, (Santarém, 1997) bacterias y productos extracelulares bacterianos (ECPs) producían un incremento de la actividad lisozima del suero de trucha arcoiris (Ackerman y col. 2000, Skov y col., 2012), tilapia del Nilo (Chen y col., 1998) y carpas infectadas con *Aeromonas punctata* (Siwicki y Studnicka, 1987), así como en salmón atlántico infectado experimentalmente con *A. salmonicida* (Moyner y col. 1993) o rodaballo infectado por *Vibrio pelagius* o *Mycobacterium spp* (Chen y col., 1998; Villamil y col., 2003).

En el presente estudio, las muestras de suero de rodaballos infectados con *T. maritimum* presentaron una capacidad bactericida y una actividad alternativa de la ruta del complemento similares a las descritas en ésta y en otras especies de peces tratados con antígenos bacterianos o protozoos ciliados (Ackerman y col., 2000; Sitjà-Bobadilla y col., 2003, 2008). Los resultados también indican que las actividades bactericidas y de la vía alternativa del complemento del suero varían con el tiempo. Así, 6h post-infección la actividad bactericida del suero de peces inoculados con la cepa de *T. maritimum* experimentaba un incremento no significativo con respecto a los valores observados en peces control mientras que la actividad de la vía alternativa del complemento disminuía durante este mismo período, retornando ambas actividades a valores similares a los de peces control a partir de las 24h. Estos resultados concuerdan con los descritos por Mabrok y col (2016) en lenguado senegalés y sugieren que *T. maritimum* ha desarrollado estrategias para inhibir o eluir dicha respuesta.

El principal componente de la inmunidad innata celular lo constituyen los macrófagos, que aparecen de manera temprana en las inflamaciones y en muchos casos sirven de vehículo a los patógenos para llegar a diferentes órganos y evitar ser destruidos por el sistema inmune (Penagos,, 2009, Pulido, 2004). En el presente estudio se ha evaluado la actividad estallido respiratorio de macrófagos obtenidos de rodaballos infectados con *T. maritimum* y de peces control con el fin de evaluar su papel frente a la infección por este patógeno. Los resultados obtenidos demostraron que los macrófagos de peces infectados con *T. maritimum* muestran índices de estimulación (IE) similares o inferiores a los observados en peces control a lo largo de todo el período analizado, lo cual sugiere que estos microorganismos podrían tener capacidad para sobrevivir en el interior de los macrófagos inhibiendo el estallido oxidativo. La capacidad de supervivencia en el interior de los macrófagos ha sido ya descrita en otras patógenas de peces como *Renibacterium salmoninarum* (Campos-Pérez y col., 1997) y *Aeromonas salmonicida* (Stave y col., 1985; Sakai y col., 1993a; Barnes y col., 1999; Boesen

y col., 2001). Futuros estudios deberán centrarse en el esclarecimiento de los mecanismos utilizados por *T. maritimum* para evadir la fagocitosis o para adaptarse a la vida intracelular y sobrevivir a la acción de los compuestos tóxicos liberados por los fagocitos durante el estallido respiratorio o inhibiéndolo.



6. EFICACIA DE LA IMMUNIZACIÓN: FACTORES INHERENTES A LA VACUNA

6.1.- Materiales y Métodos

6.1.1.- Vacunas y vías de administración

Se han utilizado vacunas comerciales frente a la vibriosis, furunculosis y tenacibaculosis y vacunas en fase experimental frente a la tenacibaculosis. Las cepas bacterianas utilizadas en la preparación de las vacunas y en las infecciones experimentales se recogen en la Tabla 31.

Tabla 25.- Cepas utilizadas en el presente estudio

Especie	Cepa	Serotipo
<i>Tenacibaculum maritimum</i>	LPV1.7	O2
<i>T. maritimum</i>	LL01.8.3.8	O1
<i>T. maritimum</i>	LO2-12.2.2	O1
<i>T. maritimum</i>	CO2 11.2.1	O3
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	IAS06.1	---
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	TO 96.1	---
<i>Vibrio anguillarum</i>	R82	O1
<i>V. anguillarum</i>	RG111	O2

6.1.1.1.- Preparación de vacunas experimentales

Las vacunas monovalentes TM-1, compuesta por células bacterianas completas inactivadas de la cepa LL01 8.3.8 (serotipo O1) de *T. maritimum* y FM-95, compuesta por células bacterianas completas inactivadas de la cepa LPV 1.7 (serotipo O2) de *T. maritimum* y la vacuna trivalente TM-3, compuesta por células bacterianas completas inactivadas de las cepas LL02 12.2.2 (serotipo O1), LPV 1.7 (serotipo O2) y C02 11.2.1 (serotipo O3), se prepararon en el Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela, siguiendo la metodología descrita por Santos y col. (1991) (Tabla 32). Para ello, cultivos en fase logarítmica de las cepas de *T. maritimum*, se inocularon en matraces de 2L de capacidad que contenían 1,5L de caldo FMM y se incubaron durante 48 horas a 25°C con agitación (100 rpm). Finalizado el período de incubación, los cultivos se inactivaron por adición de formaldehído a una concentración final de 0,3% (v/v) y se mantuvieron en agitación durante 3 horas a temperatura ambiente y durante 24h a 4°C. Previamente a la inactivación se tomó una muestra de la suspensión bacteriana para determinar el número de células viables y la pureza del cultivo.

Las vacunas monovalentes TM-1, FM-95 y la vacuna trivalente TM-3 [mezcla de vacunas monovalentes LL02 12.2.2 (serotipo O1), LPV 1.7 (serotipo O2) y C02 11.2.1 (serotipo O3) en proporción 1:1:1], se ajustaron a una concentración final de 1×10^9 céls/ml, utilizando FMM caldo con un 0,3% (v/v) de formaldehído como diluyente.

La esterilidad de las vacunas se comprobó utilizando la versión modificada de la

Farmacopea Británica. Para ello se inocularon 500 µl de las suspensiones bacterianas inactivadas en tubos que contenían 10 ml de Caldo FMM o caldo tioglicolato (CT, Oxoid). Transcurridos 7 días de incubación a 25°C para el medio Caldo FMM y a 37°C para el medio CT, se realizaron subcultivos en medio sólido e incubando durante 5 días a las temperaturas indicadas anteriormente. La ausencia de crecimiento en los medios Agar FMM y CT se interpretó como la ausencia de bacterias viables en las vacunas.

La inocuidad de las vacunas se comprobó siguiendo los procedimientos descritos en las monografías publicadas por la Comisión de la Farmacopea Europea para las vacunas anti-furunculosis y anti-vibriosis para peces salmónidos (Ph Eur. 2013 y 2015) así como la actual normativa europea para ensayos de seguridad y eficacia (Woodland; 2011; Adams, 2016). Con este fin, las vacunas se inocularon en dosis doble (0,2 ml) a la recomendada para uso en la especie de pez de destino. Los peces se examinaron durante un período de 21 días y sólo se consideró inocua la vacuna cuando no se observaron signos de lesión durante el período de ensayo. Para este análisis se utilizaron los criterios de valoración de Speilberg recogidos en la normativa de la agencia europea del medicamento (http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/11/WC500118226.pdf).

6.1.1.2.- Vacunas comerciales

Se utilizaron las vacunas comerciales monovalentes Icthiovac-Tm (anti-*T. maritimum*), Icthiovac-Vr (anti-*V. anguillarum*) y AVAC PEC *Aeromonas* (anti-*A. salmonicida*) y polivalentes AVAC PEC FM-95-GAVA-3 (anti-*T. maritimum*-*V. anguillarum*) y AVAC PEC FM-95-*Aeromonas* (anti-*T. maritimum*-*A. salmonicida*), diseñadas por nuestro grupo de investigación y licenciadas por la USC a Laboratorios HIPRA S.A. para su comercialización. La composición antigénica de estas vacunas se muestra en la Tabla 32.

6.1.1.3.-Inmunización de los peces

Para la realización de los estudios se utilizaron ejemplares sanos de rodaballo y lenguado provenientes de acuicultura. El centro y proyecto de experimentación autorizados, persona responsable de la realización de los ensayos, normativa vigente en la materia, así como las condiciones experimentales y de mantenimiento de los peces fueron las descritas en el apartado 3.1.3.

Tabla 26.- Vacunas utilizadas en el presente estudio

Enfermedad	Vacunas comerciales	Composición antigénica (Serotipo)
Monovalentes		
Tenacibaculosis	Ichthovac-Tm	<i>T.maritimum</i> LPV1.7 (O2)
Vibriosis	Ichthovac-Vr	<i>V. anguillarum</i> R82 (O1) <i>V. anguillarum</i> RG111 (O2α) <i>V. anguillarum</i> RV22 (O2B)
Furunculosis	AVAC PEC <i>Aeromonas</i>	<i>A. salmonicida</i> IAs 06.1
Polivalentes		
Tenacibaculosis/Furunculosis	AVAC PEC <i>Aeromonas</i> /FM-95	<i>A.salmonicida</i> IAs 06.1, <i>T.maritimum</i> LPV1.7(O2)
Tenacibaculosis/Vibriosis	AVAC PEC FM-95/GAVA-3	<i>T.maritimum</i> LPV1.7 (O2) <i>V. anguillarum</i> R82 (O1) <i>V. anguillarum</i> RG111 (O2α) <i>V. anguillarum</i> RV22 (O2B)
Enfermedad	Vacunas experimentales	Composición antigénica (Serotipo)
Tenacibaculosis	FM-95	<i>T. maritimum</i> LPV1.7 (O2)
Tenacibaculosis	TM-1	<i>T. maritimum</i> LL01.8.3.8 (O1)
Tenacibaculosis	TM-3	<i>T.maritimum</i> LL02 12.2.2(O1) <i>T.maritimum</i> LPV 1.7 (O2) <i>T.maritimum</i> C02 11.2.1 (O3)

Las vacunas se administraron por inyección e inmersión o baño corto:

Inyección: Los peces se anestesiaron con MS222 (100 mg/l) y se inmunizaron mediante inyección de 0,1 ó 0,2 ml (aproximadamente 10^8 UFC/pez) de la vacuna, en el seno dorsal medio, la cavidad celómica o por vía intramuscular. Como control se utilizaron peces inyectados por la misma vía con 0,1 de solución salina estéril con formaldehído al 0,3% (v/v).

Inmersión: Los peces se inmunizaron mediante baño corto durante 1 minuto en la vacuna diluída 1:10 en agua de mar. Transcurrido ese tiempo los peces se transfirieron de nuevo a los tanques de mantenimiento. Transcurridos 30 días desde la primera inmunización, se administró una dosis de recuerdo. Los peces control fueron manipulados de la misma manera, pero utilizando sólo agua de mar en la inmersión.

6.1.2.- Evaluación de la eficacia de las vacunas: ensayos *in vivo* e *in vitro*

6.1.2.1.- Infecciones experimentales

La eficacia de las vacunas se determinó mediante infección experimental y cálculo del Porcentaje Relativo de Supervivencia (RPS, Amend, 1981), siguiendo los procedimientos descritos en las monografías publicadas por la Comisión de la Farmacopea Europea para las vacunas anti-furunculosis y anti-vibriosis para peces salmónidos (Ph Eur. 2013 y 2015) así como la actual normativa europea para ensayos de seguridad y eficacia (Woodland; 2011;

Adams, 2016). Las infecciones experimentales se realizaron con las cepas IAs 06.1 de *A. salmonicida*, R-82 (serotipo O1) y RG-111 (serotipo O2) de *V. anguillarum* y LL01 8.3.8 (serotipo O1), LL02 12.2.2 (serotipo O1), LPV 1.7 (serotipo O2) y C02 11.2.1 (serotipo O3) de *T. maritimum*, siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.1.4. Para la determinación de la eficacia de las vacunas, las suspensiones de las cepas bacterianas se inocularon en los grupos de peces control y vacunados, Los peces infectados experimentalmente se examinaron durante un período de 21 días, retirándose diariamente los peces muertos para su análisis mediante los métodos microbiológicos y/o moleculares descritos en el apartado 3.1.2.

El grado de protección de las vacunas, expresado como RPS, se calculó según la fórmula:

$$RPS = 1 - \left[\frac{\% \text{ mortalidad en peces vacunados}}{\% \text{ mortalidad en peces control}} \right] \times 100$$

6.1.2.2- Efecto de la vacunación sobre la actividad respiratoria

El efecto de la inmunización sobre la actividad estallido respiratorio de los granulocitos se determinó siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.1.3.4. Se utilizaron 10 peces de cada grupo en cada uno de los ensayos. Los resultados se expresaron mediante el índice de estimulación (IE) calculado según la siguiente fórmula:

$$IE = \frac{\text{GMFI de leucocitos estimulados}}{\text{GMFI de leucocitos no estimulados}}$$

Donde GMFI representa la media geométrica de la intensidad de fluorescencia. El valor se expresó como la media \pm Error Estándar (EE).

6.1.2.3.- Efecto de la vacunación sobre la respuesta inmune humoral

La respuesta inmune humoral específica se determinó valorando los niveles de anticuerpos específicos en el suero de peces inmunizados y control, utilizando un inmunoensayo enzimático (ELISA) indirecto (Estévez y col., 1994; Santos y col. 2005). Las muestras de suero de peces (vacunados y control), el anticuerpo secundario anti inmunoglobulina de rodaballo obtenido en ratón (monoclonal UR3) y el anticuerpo terciario (anti Ig de ratón conjugado con peroxidasa) se utilizaron a una dilución 1:10, 1:2000 y 1:1000, respectivamente. La Densidad Óptica a 492 nm (DO_{492}) se determinó en un lector de microplacas (titertek Multiscan plus, Labsystems, Helsinki, Finlandia). Los resultados se expresaron como la media de los valores de la $DO_{492} \pm$ error estandar (EE).

La respuesta inmune innata se valoró mediante el análisis de la actividad lisozima según el procedimiento descrito en el apartado 4.1.2.2.

6.1.3.- Efecto del lote y tiempo postproducción de la vacuna

En este estudio se pretende evaluar si el lote de fabricación y el tiempo transcurrido desde la producción de la vacuna FM-95 influyen en el grado y duración de la protección alcanzada por el rodaballo tras la inmunización frente a *T. maritimum*. Con tal fin, se

evaluaron tres lotes de la vacuna FM-95 (Lotes 1, 2, y 3), producidos en las condiciones de cultivo descritas en el apartado 6.1.1.1 (Tabla 32). Los experimentos realizados para determinar el efecto del lote y tiempo postproducción en la eficacia de la vacunación (Experimento 1) y el efecto del lote de vacuna en la duración de la protección (experimento 2) se muestran en la Tabla 33:

Experimento 1. Efecto del lote y tiempo postproducción en la eficacia de las vacunas. Transcurridos 0, 9, 12, 18, 24 y 27 meses tras la producción de los lotes 1,2 y 3 de la vacuna FM-95 se realizaron ensayos de eficacia. En cada período (0, 9, 12, 18, 24 y 27) se inmunizaron rodaballos mediante inyección en la cavidad celómica (0,1 ml de la vacuna) con los diferentes lotes de vacuna. Para cada uno de los lotes de vacuna y período post-producción de la vacuna ensayados se emplearon 50 rodaballos de 30 gramos vacunados y un número igual de peces control a los que se les administró solución salina estéril en lugar de la vacuna (Tabla 33).

Experimento 2. Efecto del lote de producción de la vacuna en la duración de la inmunidad. Los peces se inmunizaron con cada uno de los tres lotes de la vacuna FM-95 mediante inyección en la cavidad celómica de 0.1 ml de la vacuna, para ello se utilizaron 80 rodaballos de 30 g para cada lote de vacuna (Tabla 33).

La eficacia de la inmunización se evaluó mediante infección experimental, según lo descrito en el apartado 6.1.2.1, a los 28 días (Experimento 1) y a los 6 meses post-vacunación (Experimento 2), utilizando 50 peces de cada grupo vacunado y 50 peces control (inyectados con solución salina estéril) y las suspensiones bacterianas de la cepa de *T. maritimum* LPV 1.7 ajustadas a una concentración de 10^9 UFC/ml.

En los peces del experimento 2 se determinó también el efecto de la inmunización sobre la actividad estallido respiratorio de los granulocitos (ver apartado 6.1.2.2) transcurridos 45 y 180 días post inmunización y sobre la respuesta inmune humoral específica (ver apartado 6.1.2.3) transcurridos 30 días post vacunación. Para estos ensayos se utilizaron 10 peces de cada grupo inmunizado y el mismo número de peces del grupo control.

6.1.4.-Efecto de la composición antigénica de la vacuna

En este estudio se ha evaluado influencia de la composición antigénica en la eficacia de la vacuna frente a *T. maritimum*, *A. salmonicida* y *V. anguillarum*. Con este fin se evaluaron vacunas anti- tenacibaculosis marina (vacunas FM-95, TM-1 y TM-3) que contenían antígenos de cepas de *T. maritimum* de diferente serotipo o aisladas de diferentes especies de pez y vacunas polivalentes que contenían antígenos de cepas de *T. maritimum* y *A. salmonicida* (AVAC PEC *Aeromonas*/FM-95) o de *T. maritimum* y *V. anguillarum* (AVAC PEC FM-95/GAVA-3). Los peces se inmunizaron mediante inyección en la cavidad celómica de 0.1 ml de la vacuna. Como control se utilizaron peces inyectados con 0,1 ml de solución salina estéril.

Los experimentos 3 al 6, realizados para determinar el efecto de la composición antigénica en el grado de protección y la respuesta inmune desarrollada por los peces, quedan recogidos en las Tablas 34 y 35 y se describen a continuación:

Experimento 3. Las vacunas mono y trivalentes anti-tenacibaculosis marina se evaluaron en rodaballo en condiciones de laboratorio (ensayos *in vivo* e *in vitro*) y en campo.

Ensayos de laboratorio: Se utilizaron un total de 180 rodaballos (peso medio de 30 g) distribuidos en tres grupos de 60 ejemplares cada uno. Los grupos 1 y 2 se inmunizaron con 0,1 ml de las vacunas FM-95 (antígenos del serotipo O2) y TM-3 (serotipos O1, O2 y O3), respectivamente (Tabla 34). El tercer grupo de peces (peces control) se inyectaron con 0,1 ml de PBS. La eficacia de la vacunación se evaluó a los 28 días post-vacunación mediante infección experimental, utilizando 50 peces inmunizados con cada una de las vacunas y 50 peces control. Para la infección se utilizó una mezcla de las cepas L02 12.2.2 (serotipo O1), LPV 1.7 (serotipo O2) y C02 11.2.1 (serotipo O3) ajustada a una concentración de 10^9 UFC/ml con solución salina.

En este ensayo se determinó además el efecto de la inmunización sobre la actividad estallido respiratorio de los macrófagos, transcurridos 60 días post inmunización, utilizando 10 peces de cada grupo en estudio.

Pruebas de campo: Se realizaron en una planta de cultivo de rodaballo con una alta incidencia de tenacibaculosis durante los últimos años. Se vacunaron 29.000 rodaballos con la vacuna FM-95 y 21.500 rodaballos con la vacuna TM-3. La eficacia de la inmunización se evaluó mediante el registro de mortalidades causadas por la tenacibaculosis marina en las poblaciones de peces vacunados con las vacunas FM-95 y TM-3 y en la población de peces control (25.000 peces inyectados con solución salina estéril). Con este fin, se tomaron muestras de los peces muertos o con signos de tenacibaculosis presentes en los tanques de experimentación y se sometieron a análisis bacteriológico. Para confirmar el diagnóstico, los microorganismos aislados se identificaron utilizando métodos microbiológicos convencionales, API ZYM y métodos serológicos y moleculares.

Experimento 4. Las vacunas monovalentes anti-tenacibaculosis marina se evaluaron en lenguado en condiciones de laboratorio (ensayos *in vivo* e *in vitro*).

Se vacunaron un total de 110 lenguados, con un peso medio de 5,5 g, mediante inyección subcutánea en el seno dorsal medio (SDM) con la vacuna TM-1 (elaborada con la cepa LL01 8.3.8 del serotipo O1, aislada de lenguado) y el mismo número de peces con la vacuna FM-95 (elaborada con la cepa LPV 1.7 del serotipo O2, aislada de rodaballo). A los lenguados del grupo control (120 ejemplares) se les administró solución salina estéril mediante inyección subcutánea en SDM.

La eficacia de las vacunas se evaluó a los 45 y 62 días post-vacunación mediante infección experimental, utilizando 50 peces inmunizados con cada una de las vacunas, 50 peces control y una suspensión en solución salina de la cepa LL01 8.3.8 ajustada a una concentración de 10^9 UFC/ml (Tabla 34).

El efecto de la inmunización sobre la actividad estallido respiratorio de los macrófagos se evaluó transcurridos 62 días post inmunización, utilizando 10 peces de cada grupo experimental.

Experimento 5. Las vacunas monovalentes y bivalentes anti-tenacibaculosis marina y anti-*furunculosis* se evaluaron en rodaballo en condiciones de laboratorio (ensayos *in vivo* e *in vitro*).

En este ensayo se utilizaron un total de 3000 rodaballos (peso medio de $13,5 \pm 2,1$ g), para cada uno de los grupos vacunados y el mismo número de peces para el grupo control. Los peces se vacunaron mediante inyección intracelómica de 0,1 ml de las vacunas comerciales AVAC PEC *Aeromonas*/FM-95 (Grupo G1, vacuna bivalente), Icthiovac-Tm

Tabla 27.- Efecto del lote y tiempo post-producción de la vacuna en la eficacia y duración de inmunidad (Experimentos 1 y 2).

Vacuna	Lote producción	Tiempo post-producción vacuna	Nº Peces	Cepa infección	Dosis infección estimada 10 ⁹ UFC/ml	Infección (tiempo post-vacunación)
Experimento 1: Efecto del lote y tiempo post-producción en la eficacia de las vacunas						
FM-95	Lote 1	0 meses	50	<i>T.maritimum</i> (LPV 1.7)	0.1 ml	28 días
		Control*	50			
		9 meses	50			
		Control	50			
		12 meses	50			
		Control	50			
		18 meses	50			
		Control	50			
		24 meses	50			
		Control	50			
		27 meses	50			
		Control	50			
FM-95	Lote 2	0 meses	50	<i>T.maritimum</i> (LPV 1.7)	0.1 ml	28 días
		Control	50			
		9 meses	50			
		Control	50			
		12 meses	50			
		Control	50			
		18 meses	50			
		Control	50			
		24 meses	50			
		Control	50			
		27 meses	50			
		Control	50			
FM-95	Lote 3	0 meses	50	<i>T.maritimum</i> (LPV 1.7)	0.1 ml	28 días
		Control	50			
		9 meses	50			
		Control	50			
		12 meses	50			
		Control	50			
		18 meses	50			
		Control	50			
		24 meses	50			
		Control	50			
		27 meses	50			
		Control	50			
Experimento 2: Efecto del lote de producción de la vacuna en la duración de la inmunidad						
FM-95	Lote 1	0 meses	50	<i>T.maritimum</i> (LPV 1.7)	0.1 ml	6 meses
	Lote 2	0 meses	50			6 meses
	Lote 3	0 meses	50			6 meses
Como control se utilizaron peces inyectados con solución salina estéril.						

(G2, vacuna monovalente), AVAC PEC *Aeromonas* (G3, vacuna monovalente adyuvantada), e Icthiovac-Tm y vacuna AVAC PEC *Aeromona* (G4, vacunas monovalentes administradas consecutivamente con un mes de intervalo) o se inyectaron con 0, 1ml de solución salina estéril (grupo G5). Los peces se mantuvieron en la granja de cultivo hasta su traslado al animalario de la Facultad de Biología para la realización de los retos infecciosos (ensayos *in vivo*) y la toma de muestras para el estudio de la respuesta inmune celular mediante análisis del estallido respiratorio de los macrófagos (ensayos *in vitro*).

La eficacia de la inmunización se evaluó a los 15, 50 y 75 días post-vacunación mediante infección experimental. Se utilizaron 50 peces inmunizados con cada una de las vacunas y 50 peces control para la infección experimental con la cepa LPV1.7 de *T. maritimum* y el mismo número de peces vacunados y control para la infección con la cepa IAs06.1 de *A. salmonicida* ajustadas a una concentración de 10^9 UFC/ml (Tabla 35).

El efecto de la inmunización sobre la actividad estallido respiratorio de los macrófagos se evaluó transcurridos 15 y 50 días post inmunización utilizando 10 peces para cada grupo. Además, se evaluó la actividad lisozima (apartado 6.1.2.3) para los grupos de peces G1, G2, G3 y G4 transcurridos 30 y 50 días tras la inmunización.

Experimento 6. Las vacunas monovalentes (Icthiovac-Tm y Icthiovac-Vr) y bivalentes anti-tenacibaculosis marina y anti-*V. anguillarum* (AVAC PEC FM-95/GAVA-3) se evaluaron en rodaballo en condiciones de laboratorio (ensayos *in vivo* e *in vitro*).

En este ensayo se utilizaron un total de 480 rodaballos (peso medio de $13,5 \pm 2,1$ g), distribuidos en tres grupos (120 peces cada uno) inmunizados por vía celómica con 0,1 ml de las vacunas Icthiovac-Tm (G1), Icthiovac-Vr (G2), AVAC PEC FM-95/GAVA-3 (G3) y el grupo control (120 peces), inyectados con 0,1 ml de solución salina estéril (Tabla 36).

La eficacia de la inmunización se evaluó a los 28 días post-vacunación mediante infección experimental, utilizando 50 peces inmunizados con cada una de las vacunas y 50 peces control para cada una de las suspensiones bacterianas utilizadas en el reto infeccioso. En la infección se utilizaron suspensiones de la cepa LPV1.7 de *T. maritimum* y una mezcla de las cepas R82 y RG111 de *V. anguillarum* ajustadas a una concentración de 10^9 UFC/ml (Tabla 36). El efecto de la inmunización sobre la respuesta inmune humoral específica se determinó mediante ELISA, utilizando los sueros de los peces vacunados con las vacunas mono y bivalentes obtenidos 30 días post inmunización.

Tabla 28.- Efecto de la composición antigénica (Experimentos 3 y 4).

Experimento 3: Evaluación de la eficacia de vacunas mono y trivalentes anti-tenacibaculosis marina en rodaballo

Ensayo de laboratorio: ensayos <i>in vivo</i>				
Tratamiento	Nº peces	Infección experimental		
		Cepa infección	Dosis estimada 10 ⁹ UFC/ml	Infección (Tiempo post- vacunación)
Vacuna FM-95 (O2)	50	<i>T. maritimum</i> LO2-12.2.2 (O1)	0.1 ml	28 días
Vacuna TM-3 (O1,O2,O3)	50	LPV 1.7 (O2)		
Control	50	CO2 11.2.1 (O3)		
Ensayo de laboratorio: ensayos <i>in vitro</i>				
Vacuna FM-95 (O2)	10	Determinación de la actividad respiratoria de los macrófagos a los 45 y 180 días post-vacunación		
Vacuna TM-3 (O1,O2,O3)	10			
Control	10			
Estudios de campo				
Tratamiento	Nº Peces	Registro de mortalidad y diagnóstico microbiológico		
Vacuna FM-95 (O2)	29000	*Análisis microbiológico convencional		
Vacuna TM-3 (O1,O2,O3)	21500	*API ZYM		
Control	25000	*Métodos serológicos		
		*Métodos moleculares (PCR)		
Experimento 4: Evaluación de la eficacia de vacunas monovalentes anti-tenacibaculosis marina en lenguado.				
Ensayo <i>in vivo</i>				
Tratamiento	Nº Peces	Cepa infección	Dosis estimada 10 ⁹ UFC/ml	Infección (Tiempo post- vacunación)
Vacuna TM-1 (O1)	100	cepa LL01 8.3.8	0.1 ml	45 y 62 días
Vacuna FM-95(O2)	100			
Control	100			
Ensayo <i>in vitro</i>				
VacunaTM-1 (O1)	10	Determinación de la actividad respiratoria de los macrófagos 62 días post-vacunación		
Vacuna FM-95(O2)	10			
Control	10			

Tabla 29.- Evaluación de vacunas mono y bivalentes anti-tenacibaculosis y anti-*A.salmonicida* en rodaballo (Experimento 5)

Grupo/Nº Peces	Vacuna y procedimiento de vacunación		Cepa infección	Infección (Tiempo post-vacunación)
	Primera dosis	Segunda dosis ^o		
G1/3000	AVAC PEC <i>Aeromonas</i> /FM-95	-	<i>T. maritimum</i> (LPV1.7)	15 días
			<i>A. salmonicida</i> (IAS06.1)	15 días
			<i>T. maritimum</i> (LPV1.7)	50 días
			<i>A. salmonicida</i> (IAS06.1)	50 días
			<i>T. maritimum</i> (LPV1.7)	75 días
			<i>A. salmonicida</i> (IAS06.1)	75 días
G2/3000	Icthiovac-Tm	-	<i>T. maritimum</i> (LPV1.7)	15 días
			<i>T. maritimum</i> (LPV1.7)	50 días
			<i>T. maritimum</i> (LPV1.7)	75 días
G3/3000	AVAC PEC <i>Aeromonas</i>	-	<i>A. salmonicida</i> (IAS06.1)	15 días
			<i>A. salmonicida</i> (IAS06.1)	50 días
			<i>A. salmonicida</i> (IAS06.1)	75 días
G4/3000	Icthiovac-Tm	AVAC PEC <i>Aeromonas</i>	<i>T. maritimum</i> (LPV1.7)	15 días
			<i>A. salmonicida</i> (IAS06.1)	15 días
			<i>T. maritimum</i> (LPV1.7)	50 días
			<i>A. salmonicida</i> (IAS06.1)	50 días
			<i>T. maritimum</i> (LPV1.7)	75 días
			<i>A. salmonicida</i> (IAS06.1)	75 días
G5/3000	Control ^b	-	<i>T. maritimum</i> (LPV1.7)	15 días
			<i>A. salmonicida</i> (IAS06.1)	15 días
			<i>T. maritimum</i> (LPV1.7)	50 días
			<i>A. salmonicida</i> (IAS06.1)	50 días
			<i>T. maritimum</i> (LPV1.7)	75 días
			<i>A. salmonicida</i> (IAS06.1)	75 días

Como control se utilizaron peces inyectados con solución salina estéril.

Tabla 30.- Evaluación de vacunas mono y bivalentes anti-tenacibaculosis y anti-vibriosis en rodaballo (Experimento 6).

Vacunas	Nº peces vacunados	Cepa infección	Dosis infección estimada 10 ⁹ UFC/ml	Infección (Tiempo post-vacunación)
Icthiovac-Tm	70	<i>T.maritimum</i> (LPV 1.7)		
Icthiovac-Vr	70	<i>V. anguillarum</i> (R82+RG111)		
FM-95/ GAVA3	70	<i>T.maritimum</i> (LPV 1.7)	0.1 ml	28 días
	70	<i>V. anguillarum</i> (R82+RG111)		
Control*	70	<i>T.maritimum</i> (LPV 1.7)		
	70	<i>V. anguillarum</i> (R82+RG111)		

Como control se utilizaron peces inyectados con solución salina estéril.

6.1.5.- Análisis estadístico

Para determinar si existen diferencias significativas en los niveles de supervivencia entre los peces vacunados y los peces control inyectados con solución salina estéril (peces no inmunizados) se realizó un test de chi-cuadrado usando un nivel de significación de $p \leq 0,05$.

Los resultados de la actividad respiratoria de los granulocitos, la actividad lisozima del suero y los niveles de anticuerpos de los peces control y vacunados se expresaron como la media \pm error estándar (EE) de los datos analizados y se compararon usando un ANOVA de

una vía y el test de Bonferroni, utilizando el modelo de U de Mann-Whitney para comprobar la heterogeneidad de dos muestras ordinales. Los análisis se realizaron utilizando el programa IBM SPSS Statistics 22 y se consideró un nivel de confianza del 95% ($p \leq 0,05$).

6.2.- Resultados

6.2.1.- Efecto de parámetros de producción de la vacuna en la eficacia

En este estudio se han analizado la influencia del lote de producción y de la composición antigénica de la vacuna en el desarrollo y/o duración de la respuesta inmune protectora en rodaballo y lenguado.

Los resultados de los ensayos del efecto del lote (Lotes 1, 2 y 3) y tiempo postproducción de la vacuna (0 a 27 meses) en la protección de los peces frente a la tenacibaculosis se muestran en la Tabla 37. Aunque en todos los experimentos la mortalidad del grupo control fue inferior al 60% recomendado en las directrices de la Agencia Europea del Medicamento, el porcentaje de mortalidad de los peces vacunados con la vacuna FM-95 fue siempre significativamente inferior al de los peces control no inmunizados ($p < 0,05$), (Tabla 37). Los valores de RPS para los peces vacunados con la vacuna FM-95 (Lotes 1, 2 y 3) a los 0, 9, 12, 18, 24 y 27 meses postproducción oscilaron entre 80 y 100% (Tabla 37).

En los sistemas de producción intensiva de peces, además de determinar los niveles de protección alcanzados tras la vacunación, es necesario conocer la duración de dicha protección ya que va a determinar la necesidad de tener que administrar o no una dosis de recuerdo de la vacuna. Por ello, en este estudio se evaluó la eficacia de la vacuna FM-95 (Lotes 1, 2 y 3) transcurridos 6 meses desde la inmunización de los rodaballos (Experimento 2). Los resultados de la infección experimental (Tabla 38) demostraron que el porcentaje de mortalidad en el grupo de peces control fue del 62%, valor significativamente ($p \leq 0,05$) superior al observado en los peces vacunados con los lotes 1 (con una mortalidad acumulada del 19%), 2 (con una mortalidad acumulada del 20%) y 3 (con una mortalidad acumulada del 11%) de la vacuna FM-95. Los porcentajes relativos de supervivencia en los peces vacunados con los lotes 1, 2 y 3 de la vacuna acuosa FM-95 transcurridos seis meses desde la inmunización fueron de 69, 68 y 82%, respectivamente (Tabla 38).

Los resultados del ensayo de determinación de los niveles de anticuerpos transcurridos 30 días desde la vacunación con la vacuna FM-95 se muestran en la Figura 42. Los sueros de los peces inmunizados con los tres lotes de la vacuna (Lotes 1, 2 y 3) mostraron niveles de anticuerpos similares entre sí (rango de DO_{492} entre $0,36 \pm 0,004$ y $0,40 \pm 0,015$) y superiores a los observados en peces control (DO_{492} $0,31 \pm 0,020$).

En el experimento 2 se evaluó también el efecto de la vacunación sobre la respuesta inmune celular del rodaballo, analizada mediante el estudio de la actividad estallido respiratorio de los granulocitos renales en peces vacunados y control. Los resultados obtenidos demostraron que, 45 días después la inmunización, los granulocitos de los peces vacunados mostraban una actividad respiratoria, expresada como Índice de estimulación (IE), entre 5 a 8 veces superior a la observada en los granulocitos de los peces control (Tabla 39). Sin embargo, 180 días después de la inmunización los valores de IE observados en los granulocitos de peces control y vacunados eran similares. En el presente estudio, no se han observado diferencias significativas ($p < 0,05$) en el IE en función del lote de vacuna utilizado, transcurridos 45 y 180 días post inmunización.

Tabla 31.- Efecto del lote de fabricación de la vacuna FM-95 en el grado de protección (Experimento 1)

Vacuna FM-95	Tiempo post-producción de la vacuna	Nº Peces	% de muertos	RPS*
Lote 1	0 meses	50	0	100
	Control	50	50	
	9 meses	50	10	80
	Control	50	50	
	12 meses	50	1	98
	Control	50	50	
	18 meses	50	5	90
	Control	50	50	
	24 meses	50	8	81,4
	Control	50	43	
	27 meses	50	2	95,7
	Control	50	47	
Lote 2	0 meses	50	0	100
	Control	50	44	
	9 meses	50	9	82
	Control	50	50	
	12 meses	50	4	92
	Control	50	50	
	18 meses	50	7	84,8
	Control	50	46	
	24 meses	50	2	95,3
	Control	50	43	
	27 meses	50	6	87,2
	Control	50	47	
Lote 3	0 meses	50	2	95
	Control	50	45	
	9 meses	50	7	80,5
	Control	50	36	
	12 meses	50	6	87
	Control	50	45	
	18 meses	50	5	87,8
	Control	50	41	
	24 meses	50	6	87,5
	Control	50	48	
	27 meses	50	5	86,7
	Control	50	45	

Porcentaje relativo de supervivencia (RPS)=1-(%mortalidad en peces vacunados/% mortalidad en peces control)
x100

Tabla 32.- Evaluación de la duración de la inmunidad conferida por la vacuna FM-95 en rodaballo (Experimento 2)

Vacuna FM-95	Nº de peces	Infección (tiempo post- vacunación)	Bacteria/dosis de infección	% Mortalidad	RPS
Lote 1	50	6 meses	LPV 1.7 10 ⁹ UFC/ml	19	69
Lote 2	50			20	68
Lote 3	50			11	82
Control	50			62	----

Porcentaje relativo de supervivencia (RPS)= 1- (%mortalidad en peces vacunados/% mortalidad en peces control)x100

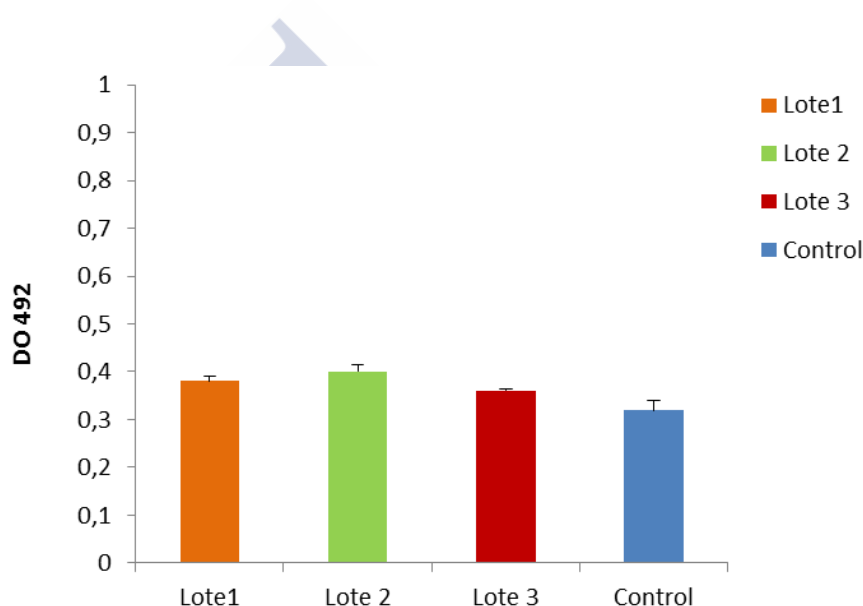


Figura 42.- Niveles de anticuerpos en peces del grupo control y peces inmunizados con distintos lotes de producción (lotes 1,2 y 3) de la vacuna FM-95.

Tabla 33.- Actividad respiratoria de los macrófagos de riñón anterior de rodaballos inmunizados con diferentes lotes de la vacuna FM-95 (Experimento 2).

Vacuna FM-95	Nº de peces	IE 45 días post-vacunación	IE 180 días post-vacunación
		Media±ES	Media±ES
Lote 1	5	15,0±2,0	0,9±0,0
Lote 2	5	18,0±2,0	5,0±2,0
Lote 3	5	22,3±2,0	3,0±2,0
Control	5	3,3±0,4	3,8±2,0

Índice de estimulación (IE)= media geométrica de la intensidad de fluorescencia en leucocitos estimulados con PMA/media geométrica de la intensidad de fluorescencia en muestras no estimuladas. El valor se expresa como la media ± Error Estándar (ES).

6.2.2.- Efecto de la composición de las vacunas en la eficacia de la inmunización

Otro de los factores que pueden afectar la eficacia de la inmunización es la composición antigénica de las vacunas. En este estudio se ha evaluado el efecto de la composición antigénica utilizando vacunas anti-tenacibaculosis marina elaboradas con una cepa de *T. maritimum* del serotipo O1 (vacuna FM-95) o con tres cepas de *T. maritimum* de los serotipos O1, O2 y O3 (vacuna TM-3). Los experimentos se realizaron a escala de laboratorio y en condiciones de campo (ver Tabla 34, Experimento 3 en materiales y métodos).

Los resultados de las infecciones experimentales realizadas para determinar el efecto de la composición antigénica en la eficacia de las vacunas FM-95 y TM-3 se muestran en la Tabla 40. La mortalidad acumulada en el grupo de peces control, transcurridos 21 días desde el inicio de la infección experimental fue del 100%, valor significativamente ($p \leq 0,05$) superior al observado en los peces vacunados con la vacuna FM-95 (mortalidad acumulada = 10%) y TM3 (mortalidad acumulada = 11%). Ambas vacunas confieren al rodaballo niveles elevados de protección frente a la tenacibaculosis marina (RPS entre 89-90%) (Tabla 40). No existen diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en el grado de protección alcanzado por los peces inmunizados con la vacuna monovalente FM-95 y la trivalente TM-3. Los resultados de las pruebas de campo con las vacunas FM-95 y TM-3 (registro de mortalidades específicas), realizadas en una planta de producción de rodaballo se muestran en la Tabla 41. Durante el período de tiempo analizado (180 días), se observaron niveles de mortalidad similares en los peces vacunados con las vacunas monovalente FM-95 (2,4%) y trivalente TM-3 (2,5%). La mortalidad en el grupo de peces no inmunizados (grupo control) fue del 10%. Se han observado diferencias significativas ($p < 0,05$) en los niveles de supervivencia entre peces control y peces inmunizados con ambas vacunas. En todos los casos, el agente causal de las mortalidades fue identificado como *T. maritimum* por métodos microbiológicos y moleculares.

Tabla 34.- Eficacia de las vacunas FM-95 y TM-3 evaluadas a escala de laboratorio (Experimento 3, infección experimental).

Grupo de peces	Nº de peces	Infección (tiempo post- vacunación)	Bacteria/ dosis de infección	%Mortalidad	RPS
Vacunados FM-95	50	30	L02 12.2.2+LPV1.7+C02 11.2.1 10 ⁹ UFC/ml	10	90
Vacunados TM-3	50	30		11	89
Control	50	30		100	

Porcentaje relativo de supervivencia (RPS)= $1 - (\% \text{mortalidad en peces vacunados} / \% \text{mortalidad en peces control}) \times 100$

Tabla 35.- Eficacia de las vacunas FM-95 y TM-3 evaluadas en condiciones de campo (Experimento 3, registro de mortalidad).

Grupo de peces	Nº de peces	Días post-vacunación	%Mortalidad
Vacunados	29.000	180	2,4
FM-95	21500	180	2,5
Control	25.000	180	10

Con respecto al estudio de la actividad respiratoria de los leucocitos renales en rodaballos inmunizados con las vacunas FM-95 y TM-3, se ha observado que, 60 días después de la vacunación, los granulocitos del riñón anterior de los peces vacunados con las vacunas FM-95 y TM-3 no mostraban una actividad respiratoria (IE) significativamente superior ($p \leq 0,05$) a la observada en los peces control (Tabla 42).

Tabla 36.- Actividad respiratoria de los granulocitos de riñón anterior de rodaballos inmunizados con las vacuna FM-95 y TM-3.

Grupo de peces	Nº de peces analizados	IE* Media±ES
Vacunados con FM-95	10	6,5±1,6
Vacunados con TM-3	10	7,4±2,3
Control	10	5,3±1,6

Índice de estimulación (IE)= media geométrica de la intensidad de fluorescencia en leucocitos estimulados con PMA/media geométrica de la intensidad de fluorescencia en muestras no estimuladas. El valor se expresa como la media ± Error Estándar (EE).

Por otra parte, hemos analizado si las cepas de *T. maritimum* aisladas de lenguado y rodaballo presentaban antígenos con diferente potencial inmunogénico para ambas especies de peces y podían inducir, por ello, una respuesta inmune protectora distinta. Para esclarecer este aspecto se comparó el grado de protección frente a la tenacibaculosis marina alcanzado por lenguados inmunizados con las vacunas monovalentes FM-95 (elaborada con la cepa LPV1.7 del serotipo O2, aislada de rodaballo) y TM-1 (elaborada con la cepa LL01 8.3.8 del serotipo O1, aislada de lenguado) (Tabla 34, Experimento 4).

Los resultados de los ensayos de eficacia con las vacunas FM-95 y TM-1 se muestran en la Tabla 43. Ambas vacunas confieren al lenguado niveles elevados de protección frente a la tenacibaculosis marina (RPS $\geq 88\%$). No se observaron diferencias significativas en el grado de protección conferido por ambas vacunas ($p \leq 0,05$).

La Tabla 44 muestra la actividad respiratoria de los leucocitos de lenguados inmunizados con las vacunas FM-95 y TM-1 transcurridos 62 días desde la vacunación. No se encontraron diferencias significativas en los IE entre peces vacunados y control ni entre los peces vacunados con FM-95 y TM-1 (Tabla 44).

Tabla 37.- Eficacia de las vacunas FM-95 y TM-1 en lenguado.

Grupo de peces	Nº de peces	Infección (tiempo post-vacunación)	Bacteria/dosis de infección	% Mortalidad	RPS
Vacunados FM-95	50	28 días	LL01 8.3.8 10 ⁹ UFC/ml	4	92
Vacunados TM-1	50			6	88
Control	50			50	----

Porcentaje relativo de supervivencia (RPS)= 1- (%mortalidad en peces vacunados/% mortalidad en peces control) x100

Tabla 38.- Actividad respiratoria de los granulocitos de riñón anterior de lenguados inmunizados con las vacuna FM-95 y TM-1.

Grupo de peces	Nº de peces analizados	IE* Media±ES
Vacunados con FM-95	10	0.56±0.09
Vacunados con TM-1	10	0.92±0.05
Control	10	0.92±0.01

Índice de estimulación (IE)= media geométrica de la intensidad de fluorescencia en leucocitos estimulados con PMA/media geométrica de la intensidad de fluorescencia en muestras no estimuladas. El valor se expresa como la media ± Error Estándar (EE).

También se ha evaluado el efecto de la eficacia de vacunas bivalentes frente a *T. maritimum*-*Aeromonas salmonicida* y frente a *T. maritimum*-*V. anguillarum* en comparación con las respectivas vacunas monovalentes anti-*T. maritimum*, anti-*A. salmonicida* y anti-*V. anguillarum*.

Los resultados de los ensayos de evaluación de la eficacia de las vacunas mono y bivalentes frente a la tenacibaculosis y la furunculosis transcurridos 15, 50 y 75 días desde la inmunización se muestran en la Tabla 45. Los ensayos de eficacia realizados a los 15 días de la administración de la vacuna monovalente AVAC PEC *Aeromonas* y de la vacuna bivalente AVAC PEC *Aeromonas*/FM-95, demostraron la existencia de niveles elevados de protección frente a *A. salmonicida* con valores de RPS de 77% y 63,5%, respectivamente. Por el contrario, se observaron niveles de protección bajos (RPS=18) o nulos frente a *T. maritimum* debido, probablemente, a la elevada dosis de bacterias utilizadas en la infección experimental.

El cálculo del porcentaje relativo de supervivencia transcurridos 50 días desde la inmunización, puso de manifiesto que la administración de la vacuna bivalente AVAC PEC *Aeromonas*/FM-95 en una única dosis o la administración secuencial de la vacuna monovalente FM-95 seguida de la administración, treinta días después, de la vacuna AVAC PEC *Aeromonas*, confieren niveles de protección frente a *T. maritimum* (rango de RPS entre 66,2% y 81%) y *A. salmonicida* (rango de RPS entre 55,5% y 65,6%) superiores a los obtenidos con las respectivas vacunas monovalentes Ictiovac-Tm (RPS=53,7) y AVAC PEC *Aeromonas* (RPS 19,5) (Tabla 45). Se observó la misma tendencia al evaluar la eficacia de las vacunas transcurridos 75 días desde la inmunización, aunque en este caso, la eficacia de la vacuna frente a *A. salmonicida* fue inferior (RPS<36), probablemente debido a la elevada concentración de bacterias utilizadas en la infección experimental ($1,2 \times 10^{12}$ UFC/ml).

El análisis del suero de los peces reveló un aumento significativo ($p \leq 0,05$) de la actividad lisozima en los peces inmunizados con las vacunas monovalente AVAC PEC *Aeromonas* y bivalente AVAC PEC *Aeromonas*/FM-95 con respecto al control transcurridos cincuenta días desde la inmunización (Figura 43). El suero de los peces inmunizados secuencialmente (primero con la vacuna FM-95 y 30 días después con la vacuna AVAC PEC *Aeromonas*), mostró una actividad lisozima similar a la observada en peces inmunizados con la vacuna bivalente y significativamente superior ($p \leq 0,05$) a la observada en los peces control.

EL análisis de actividad respiratoria demostró que los granulocitos de peces vacunados con la vacuna bivalente AVAC PEC *Aeromonas* y los vacunados primero con la vacuna Ictiovac Tm y 30 días después con la vacuna AVAC PEC *Aeromonas* tienen una actividad no significativamente superior a la de los peces control transcurridos 50 días desde la vacunación inicial (Tabla 46).

Los resultados de los ensayos de evaluación de la eficacia de las vacunas mono y

bivalentes frente a la tenacibaculosis y la vibriosis transcurridos 28 días desde la inmunización se muestran en la Tabla 47. El cálculo del porcentaje relativo de supervivencia demostró que la vacuna bivalente AVAC PEC FM95/GAVA-3 confería niveles altos de protección frente a *T. maritimum* (RPS=100) y *V. anguillarum* (RPS= 81,2). Se obtuvieron niveles de protección similares cuando se utilizaron la vacuna monovalente anti-*T. maritimum* Icthiovac-Tm (RPS= 95,8) y la vacuna monovalente anti-*V. anguillarum* Icthiovac-Vr (RPS=87,5).

Los resultados del estudio de la respuesta inmune humoral de los peces inmunizados con las vacunas monovalentes Icthiovac-Tm e Icthiovac-Vr y de la bivalente AVAC PEC FM-95/GAVA-3 transcurridos 30 días desde la vacunación se muestran en la Figura 44 (experimento 6). Para estos análisis se han utilizado como antígenos una mezcla de células inactivadas con formol de las cepas R-82 (serotipo O1) y RG-111 (serotipo O2 para valorar los anticuerpos específicos frente a *V. anguillarum* y una suspensión de células inactivadas con formol de la cepa LPV1.7 (serotipo O2) para determinar los anticuerpos específicos frente a *T. maritimum* en los sueros de peces inmunizados y control.

Los sueros de peces inmunizados con las formulaciones mono y bivalentes mostraron niveles de anticuerpos específicos frente a *T. maritimum* y *V. anguillarum* no significativamente superiores ($p < 0,05$) a los observados en el suero de peces control. Los sueros de los peces inmunizados con la vacuna bivalente FM95/GAVA-3 mostraron niveles de anticuerpos frente a *T. maritimum* (rango de DO_{492} entre 0,568 y 0,915) y frente a *V. anguillarum* (rango de DO_{492} entre 1,112 y 0,021) no significativamente ($p < 0,05$) superiores a los observados en el suero de los peces inmunizados con las vacunas monovalentes Icthiovac-Vr (rango de DO_{492} entre 0,494 y 0,295) e Icthiovac-Tm (rango de DO_{492} entre 0,378 y 0,641).



Tabla 39.- Efecto de la administración de vacunas monovalentes y bivalentes frente a la furunculosis y tenacibaculosis (Experimento 5).

Infección (tiempo post-vacunación)	Vacunas y procedimientos de administración		Bacteria/dosis de infección	RPS
	Primera dosis	Segunda dosis		
15 días	Ichthiovac-Tm	-	<i>T. maritimum</i> 2,7x10 ¹² UFC/ml	0
	AVAC PEC <i>Aeromonas</i> /FM-95	-		18,7
	AVAC PEC <i>Aeromonas</i>	-	<i>A. salmonicida</i> 4x10 ⁹ UFC/ml	77,0
	AVAC PEC <i>Aeromonas</i> /FM-95	-		63,5
50 días	Ichthiovac-Tm	-		53,7
	AVAC PEC <i>Aeromonas</i> /FM-95	-	<i>T. maritimum</i> 9x10 ¹⁰ UFC/ml	66,2
	Ichthiovac-Tm	AVAC PEC <i>Aeromonas</i>		81,0
	AVAC PEC <i>Aeromonas</i>	-	<i>A. salmonicida</i>	19,5
	AVAC PEC <i>Aeromonas</i> /FM-95	-	1,5x10 ¹¹ UFC/ml	55,5
	Ichthiovac-Tm	AVAC PEC <i>Aeromonas</i>		65,6
75 días	Ichthiovac-Tm	-		50,0
	AVAC PEC <i>Aeromonas</i> /FM-95	-	<i>T. maritimum</i> 1,4x10 ¹⁰ UFC/ml	100
	Ichthiovac-Tm	AVAC PEC <i>Aeromonas</i>		78,0
	AVAC PEC <i>Aeromonas</i>	-	<i>A. salmonicida</i> 1,2x10 ¹² UFC/ml	21,0
	AVAC PEC <i>Aeromonas</i> /FM-95	-		ND
	Ichthiovac-Tm	AVAC PEC <i>Aeromonas</i>		35,5
Porcentaje relativo de supervivencia (RPS)= 1- (%mortalidad en peces vacunados/% mortalidad en peces control) x100.				

Tabla 40.- Actividad respiratoria (IE) de los leucocitos renales de rodaballos inmunizados con vacunas mono y bivalentes o vacunados secuencialmente con las vacunas monovalentes (Experimento 5).

Grupo de peces	Nº de peces	15 días post inmunización	50 días post inmunización
Vacunados con AVAC PEC <i>Aeromonas</i>	10	26,6±23,3	ND
Vacunados con Icthiovac-Tm	10	18,3±0	ND
Vacunados con AVAC PEC <i>Aeromonas</i> /FM-95	10	25,0±10	76,3±32
Vacunados Icthiovac-Tm + AVAC PEC <i>Aeromonas</i> (30 días post primera inmunización)	10	NA	84,5±37
Control	10	67,0±10	59,8±35

Índice de estimulación (IE)= media geométrica de la intensidad de fluorescencia en leucocitos estimulados con PMA/media geométrica de la intensidad de fluorescencia en muestras no estimuladas. El valor se expresa como la media ± Error Estándar (ES). ND, No determinado; NA, No aplicable.

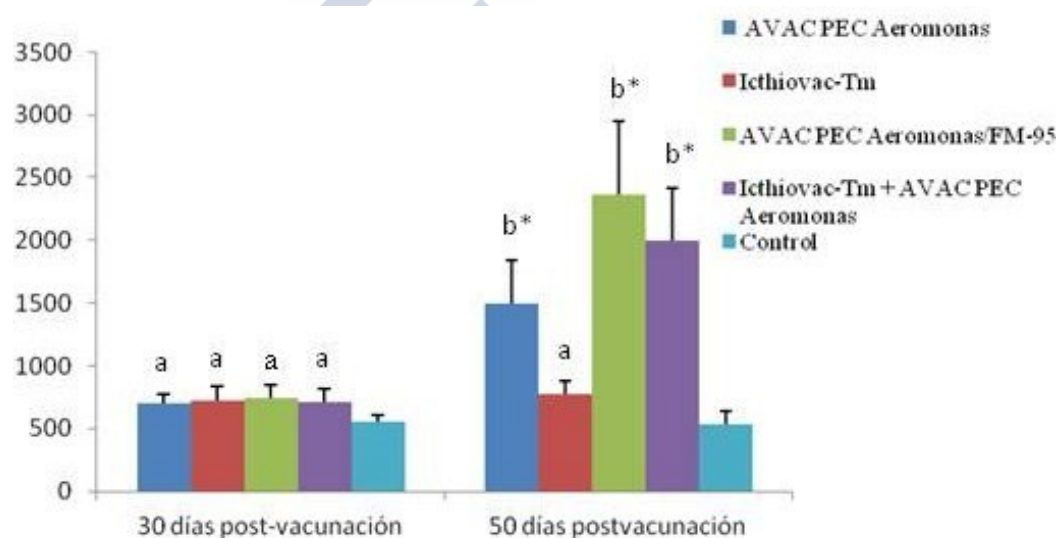


Figura 43.- Actividad lisozima de suero de rodaballos inmunizados por vía intracelómica con vacunas mono y bivalentes (Experimento 5). La existencia de diferencias estadísticas entre vacunado y control se indica con letras, las letras diferentes indican que hay diferencias significativas entre los puntos de muestreo. ($P < 0.05$).

Tabla 41.- Eficacia de la vacuna bivalente FM95/GAVA frente a la tenacibaculosis y la vibriosis en rodaballo. (Experimento 6)

Grupo de peces	Infección (tiempo post- vacunación)	Bacteria/ dosis de infección	% Mortalidad	RPS
Vacunados AVAC PEC FM-95/GAVA-3			0	100
Vacunados Icthiovac-Tm		<i>T. maritimum</i> LPV 1.7 4,2 x10 ⁹ UFC/ml	2	95,8
Control			47	
28 días				
Vacunados AVAC PEC FM-95/GAVA-3			12	81,2
Vacunados Icthiovac-Vr		<i>V. anguillarum</i> R82+RG111 1,3x10 ⁷ UFC/ml	8	87,5
Control			64	
Porcentaje relativo de supervivencia (RPS)= 1- (%mortalidad en peces vacunados/% mortalidad en peces control) x100.				

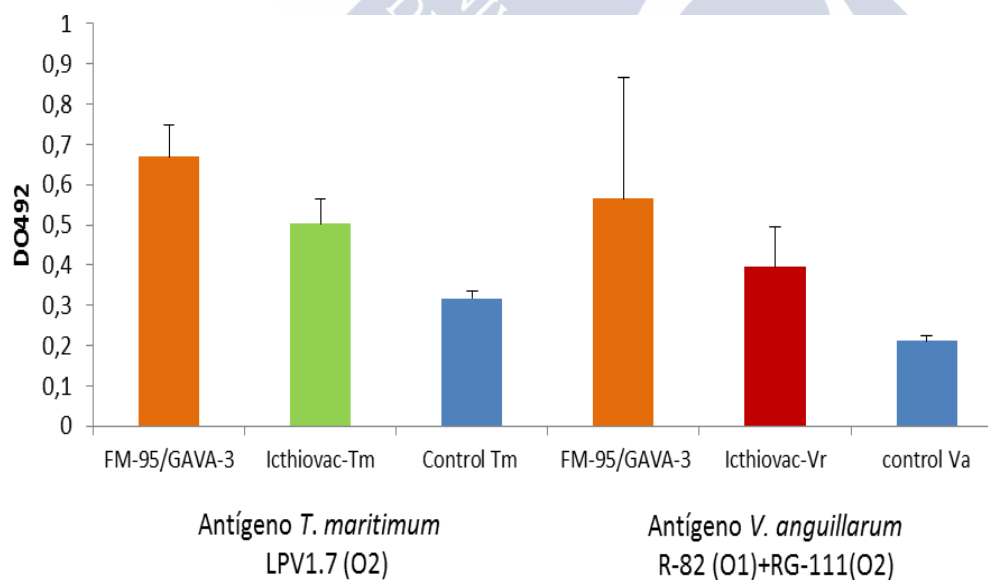


Figura 44.- Niveles de anticuerpos en peces del grupo control y peces inmunizados con las vacunas monovalentes anti-*V. anguillarum* (Icthiovac-Vr) y anti-*T. maritimum* (Icthiovac-Tm) y bivalente (AVAC PEC FM-95/GAVA-3).

6.3.- Discusión

Uno de los principales factores limitantes para el crecimiento de la piscicultura es la aparición de las enfermedades infecciosas, fundamentalmente de etiología bacteriana, que causan anualmente pérdidas cuantiosas a nivel mundial (Shoemaker y Klesius, 1997; Georgiadis y col., 2001; FAO, 2006). El control de estas patologías precisa de soluciones viables que minimicen sus efectos y permitan ofrecer al consumidor un producto limpio, reduciendo la posibilidad de aparición de resistencias y el efecto de los residuos asociados a los tratamientos con antimicrobianos sobre los sistemas ecológicos y el ser humano (Shao, 2001; Pelletier, 2004; Sommerset y col., 2005; FAO, 2006). La vacunación es considerada una herramienta ideal para el control de enfermedades bacterianas en peces por ser un método preventivo que no genera resistencias ni residuos (Gudding y col., 1999; Shao, 2001; Bowden y col., 2003; Penagos y col. 2009).

Entre los principales obstáculos en el desarrollo de vacunas eficaces se encuentran el escaso conocimiento sobre el sistema inmune de los peces y la gran variabilidad intra e interespecífica de sus mecanismos de respuesta inmune así como, el desconocimiento de los mecanismos de virulencia de los microorganismos patógenos. Otro aspecto que se ha de considerar a la hora de desarrollar nuevas vacunas es la identificación de los antígenos con potencial inmunógeno y su efecto sobre el sistema inmune de los peces.

Con respecto a la fabricación de vacunas es fundamental conseguir la uniformidad y estabilidad de los lotes de producción ya que pueden condicionar la existencia o no de respuesta inmune y su duración.

En este capítulo se estudió en primer lugar la influencia del lote de producción y de la composición antigénica de la vacuna en el desarrollo y/o duración de la respuesta inmune protectora en peces, tomando como modelos de estudio el rodaballo como especie de pez de interés en acuicultura y como enfermedad a prevenir la tenacibaculosis causada por *T. maritimum*.

En el estudio del efecto de los parámetros relacionados con la producción (lote y estabilidad de lote) se empleó una vacuna acuosa (FM-95) frente al serotipo O2 de *T. maritimum*. Los resultados obtenidos demostraron que el lote de producción (Lotes 1, 2 y 3) y el tiempo transcurrido tras la producción de la vacuna (0 a 27 meses) no afectan a la eficacia de la vacunación valorada mediante la realización de ensayos *in vivo* (infecciones experimentales) e *in vitro* (determinación del título de anticuerpos y de la actividad estallido respiratorio de los macrófagos renales).

Así, se ha demostrado que los rodaballos inmunizados por inyección con los tres lotes de la vacuna FM-95 muestran niveles de protección elevados (rango de RPS= 80-100%) que se mantienen transcurridos seis meses después de la vacunación (RPS= 68-82%) cuando se utiliza la vía de inyección para la realización del reto infeccioso. Estos resultados contrastan con los descritos en salmón atlántico por van Gelderen y col., (2009) quienes, tras la realización de un reto infeccioso por baño, observaron niveles de supervivencia (RPS) del 28% o superiores al 70% transcurridos 27 días desde la inmunización de los peces con una vacuna acuosa o con una vacuna con el adyuvante oleoso incompleto de Freund, respectivamente. Las divergencias observadas entre ambos estudios pueden atribuirse al uso de diferentes especies de pez como modelo experimental y de diferentes vacunas así como de distintas cepas bacterianas y rutas de infección.

Por otra parte, en el presente estudio se observó un incremento no significativo en el título de anticuerpos específicos (rango de DO₄₉₂ entre 0,36±0,004 y 0,40±0,015) y en la

actividad respiratoria de los macrófagos renales (IE= 15,0-22,3) de peces vacunados con respecto a los valores observados en los peces control. Estos resultados concuerdan con estudios previos en peces (Secombes, 1994, Kitlen y col., 1997; Villamil y col. 2002) en los que se detectó un aumento de la actividad respiratoria de los macrófagos (30 días post-vacunación) y en los niveles de anticuerpos circulantes tras la vacunación. Todos estos resultados parecen indicar que además de la respuestas inmune humoral específica y la inmunidad celular otros factores deben ser responsables de la protección del rodaballo frente a la tenacibaculosis.

En base a todos estos datos se podría considerar que la vacuna acuosa monovalente frente a *T. maritimum* FM-95 es estable y eficaz y podría ser utilizada para la prevención de la tenacibaculosis en rodaballo.

Otro de los factores que afecta a la eficacia de la inmunización es la composición antigénica de las vacunas. Estudios sobre la variabilidad antigénica de la especie *T. maritimum* (Pazos, 1997; Santos y col., 1999; Toranzo y col., 2005; Avendaño-Herrera y col. 2006; Castro y col., 2007) sugieren que la inclusión de antígenos de cepas representativas de los principales serotipos asociados a mortalidades en peces podría mejorar la eficacia de la actual vacuna frente a la tenacibaculosis compuesta por antígenos de la cepa LPV1.7 (serotipo O2) (Pazos 1997, Santos y col., 1999). Además, como los serotipos de *T. maritimum* que afectan a las especies de salmónidos y de peces marinos (rodaballo, la lubina, el besugo y el lenguado) pueden ser diferentes (Pazos, 1997; Santos y col., 1999; Avendaño-Herrera y col., 2006) las vacunas diseñadas para una especie de pez no deberían ser utilizadas para otras especies sin una evaluación previa de su eficacia. Por todo ello, en el presente estudio se ha evaluado si existen diferencias en la eficacia de las vacunas anti-tenacibaculosis en función del serotipo y de la especie de pez de procedencia de la cepa de *T. maritimum* utilizada en la formulación de las vacunas.

Con este fin se evaluaron en primer lugar vacunas anti-tenacibaculosis marina elaboradas con una cepa de *T. maritimum* del serotipo O2 (vacuna FM-95) o con tres cepas de *T. maritimum* de los serotipos O1, O2 y O3 (vacuna TM-3) en rodaballo. Los resultados obtenidos a escala de laboratorio indican que, aunque no existe competencia antigénica, la inmunización de los peces con la vacuna TM-3 (que contiene antígenos de cepas representativas de los serotipos O1, O2 y O3) no incrementa los niveles de eficacia con respecto a los obtenidos con la vacuna monovalente FM-95 (que incluye sólo antígenos frente a una cepa del serotipo O2). Los resultados del estudio de campo en el que se compararon los porcentajes de supervivencia de rodaballos inmunizados con las vacunas FM-95 y TM-3 corroboraron los resultados experimentales.

Por otra parte, se determinó el grado de protección alcanzado por lenguados inmunizados con las vacunas monovalentes FM-95 (LPV1.7 del serotipo O2, aislada de rodaballo) y TM-1 (LL01 8.3.8 del serotipo O1, aislada de lenguado). Los resultados de la infección experimental demostraron que ambas vacunas confirieron niveles elevados de protección (RPS superiores al 85%) frente a la tenacibaculosis al lenguado.

Todos estos resultados sugieren que el uso de vacunas monovalentes anti-*T. maritimum* formuladas con antígenos de una cepa virulenta representativa de uno de los serotipos patógenos de esta especie bacteriana puede ser de utilidad en la prevención de la tenacibaculosis en ambas especies de peces.

Estos resultados contrastan con los publicados para las vacunas frente a la vibriosis causada por *V. anguillarum* en bacalao (Mikkelsen y col. 2011) y rodaballo (Santos y col., 1991) en los que las vacunas monovalentes (compuestas por antígenos de un solo serotipo o subgrupo serológico) conferían niveles de protección inferiores a los obtenidos con las

vacunas trivalentes (compuestas por antígenos de varios serotipos y/o subgrupos serológicos).

Teniendo en cuenta que no todos los antígenos estimulan una respuesta inmune protectora y que el sistema inmunitario de los peces tiene una capacidad limitada para responder a sustancias antigénicas individuales, cada vez es más difícil formular nuevas vacunas comerciales seguras y efectivas (Busch RA y col., 1997). Se nos muestra así otro aspecto de interés para el desarrollo de programas de vacunación eficaces, que es conocer el efecto sobre el sistema inmune de los peces de la administración de vacunas combinadas o polivalentes o de la administración secuencial de vacunas (Greger y Goodrich, 1999; Santos, 2005; Toranzo y col., 2005; 2009), debido a la posibilidad de que se produzcan fenómenos de competencia antigénica.

En el presente estudio se ha evaluado la eficacia de una vacuna combinada frente a *T. maritimum*-*Aeromonas salmonicida* (AVAC PEC *Aeromonas*/FM-95 y AVAC PEC *Aeromonas* + FM-95,) comparándola con sus respectivas vacunas monovalentes anti-*T. maritimum* (Icthiovac-Tm), anti-*A. salmonicida* (AVAC PEC *Aeromonas*). Atendiendo al porcentaje relativo de supervivencia, se puso de manifiesto que la administración de la vacuna bivalente AVAC PEC *Aeromonas*/FM-95 en una única dosis o la administración secuencial de la vacuna monovalente FM-95 seguida de la administración (30 días) de la vacuna AVAC PEC *Aeromonas*, confieren niveles de protección superiores a los obtenidos con las respectivas vacunas monovalentes para los dos patógenos (*T. maritimum* y *A. salmonicida*). Estos datos se vieron apoyados por un incremento de la actividad lisozima del suero de los peces inmunizados con la vacuna bivalente AVAC PEC *Aeromonas*/FM-95 y de los inmunizados secuencialmente con las vacunas FM-95 y AVAC PEC *Aeromonas* con respecto a los peces control o a los inmunizados sólo con las vacunas monovalentes.

Siguiendo esta línea de investigación, se evaluó otra vacuna combinada frente a *T. maritimum*-*V. anguillarum* (FM-95/GAVA-3) comparándola con sus respectivas vacunas monovalentes anti-*T. maritimum* (Icthiovac-Tm) y anti-*V. anguillarum* (Icthiovac-Vr). También en este ensayo se observó que no existía efecto de competencia antigénica puesto que los peces inmunizados con las vacunas mono y bivalentes mostraban niveles de supervivencia elevados y sin diferencias significativas ($p < 0,05$). Asimismo, los sueros de peces inmunizados con las formulaciones bivalentes mostraron niveles de anticuerpos específicos ligeramente superiores a los observados en el suero de peces inmunizados con las vacunas monovalentes o en los peces control.

Estudios previos han demostrado la efectividad de vacunas bivalentes contra la vibriosis causada por *V. anguillarum* y la fotobacteriosis producida por *P. damsela* subsp. *piscicida* en dorada (Moriño y col. 2002) y lubina (Gravningen, 1998).

Como se ha comentado anteriormente, existen evidencias de que la composición antigénica, así como otros componentes de las vacunas pueden interactuar de forma sinérgica o antagónica y pueden estimular, reaccionar de forma cruzada, inhibir o incluso suprimir la respuesta inmune a antígenos específicos (Busch, 1997). A la vista de los resultados obtenidos en el presente estudio con las vacunas combinadas AVAC PEC *Aeromonas*/FM-95 y AVAC PEC FM-95/GAVA-3, podemos afirmar que no presentan efectos antagónicos y que se podrían utilizar estas vacunas bivalentes en una sola dosis para inmunizar a los peces frente a la furunculosis-tenacibaculosis y frente a la vibriosis-tenacibaculosis, reduciéndose los costes de manipulación para la granja, además de minimizar el estrés provocado a los peces durante los procesos de inmunización.



7. EFECTO DE LA ESTRATEGIA DE IMMUNIZACIÓN EN LA EFICACIA DE LA VACUNACIÓN

7.1.- Material y métodos

7.1.1.- Factores relacionados con la estrategia de vacunación

En este estudio se evaluó el efecto de la dosis y vía de administración de las vacunas en la eficacia de la inmunización. Con este fin se han utilizado vacunas comerciales monovalentes frente a la furunculosis y tenacibaculosis y vacunas bivalentes frente a la furunculosis y tenacibaculosis y frente a la tenacibaculosis y vibriosis, desarrolladas por nuestro grupo de investigación y comercializadas por Laboratorios HIPRA S.A (Tabla 48).

Las vacunas se administraron por inyección o por inmersión, según la metodología descrita en el apartado 6.1.1.3. Para la realización de los experimentos se utilizaron ejemplares sanos de rodaballo y lenguado provenientes de acuicultura que se vacunaron según los procedimientos descritos en el apartado 6.1.1.3.

La eficacia de la vacunación se evaluó mediante infección experimental (apartado 6.1.2.1) y estudio de la respuesta inmune celular (apartado 6.1.2.2) y. humoral (apartado 6.1.2.3). El centro y proyecto de experimentación autorizados, persona responsable de la realización de los ensayos, normativa vigente en la materia, así como las condiciones experimentales y de mantenimiento de los peces fueron las descritas en el apartado 3.1.3.

Tabla 48.-Vacunas mono y bivalentes utilizadas en el presente estudio

Enfermedad	Vacunas comerciales (Laboratorios HIPRA S.A)	Composición antigénica (Serotipo)
Monovalentes		
Tenacibaculosis	Ichthiovac-Tm	<i>T. maritimum</i> LPV1.7 (O2)
Furunculosis	AVAC PEC <i>Aeromonas</i>	<i>A. salmonicida</i> IAs 06.1
Polivalentes		
Tenacibaculosis/Furunculosis	AVAC PEC <i>Aeromonas</i> /FM-95	<i>A. salmonicida</i> IAs 06.1
		<i>T. maritimum</i> LPV1.7 (O2)
Tenacibaculosis/Vibriosis	AVAC PEC FM-95/GAVA-3	<i>T. maritimum</i> LPV1.7 (O2)
		<i>V. anguillarum</i> R82 (O1)
		<i>V. anguillarum</i> RG111 (O2α) <i>V. anguillarum</i> RV22 (O2B)

7.1.1.1.- Efecto de la dosis de vacuna

En este estudio se pretende estudiar el efecto de la dosis de vacuna en el grado de protección alcanzado por el rodaballo tras la inmunización. Con este fin se realizaron los experimentos que se describen a continuación:

Experimento 1. Evaluación de la vacuna monovalente Ictiovac-TM

En este ensayo se utilizaron rodaballos con un peso medio de $70 \pm 11,5$ g (peces pequeños) y $105 \pm 16,4$ g (peces grandes). La vacuna se evaluó en condiciones de laboratorio y campo. Los peces se vacunaron con la vacuna frente a tenacibaculosis Ictiovac-TM (Tabla 48) mediante inyección intracelómica de dosis de 0,1 ml/pez y 0,2 ml/pez. Para el estudio a escala de laboratorio se emplearon grupos de 100 peces de cada uno de los tamaños para cada dosis. Los rodaballos del grupo control se inyectaron con 0,2 ml (100 peces pequeños y 100 peces grandes). En el ensayo de campo se utilizaron 13000 rodaballos grandes y 13000 rodaballos pequeños inmunizados con dosis de 0, 1 ml de vacuna y el mismo número de ejemplares de cada talla para la dosis de 0,2 ml de vacuna. Los peces se mantuvieron en las instalaciones de cultivo durante todo el período en estudio (6 meses).

Ensayos de laboratorio: la eficacia de la inmunización se evaluó a los 28 días post-vacunación mediante infección experimental, utilizando 50 peces inmunizados con cada una de las dosis de vacuna y 50 peces control del grupo de peces pequeños y suspensiones en solución salina de la cepa LL01 8.3.8 (serotipo O1) de *T. maritimum*, ajustada a una concentración de 10^9 UFC/ml (Tabla 49). Las infecciones experimentales se realizaron en el animalario de la Facultad de Biología.

Ensayos de campo: La eficacia de la vacunación se evaluó mediante el registro de mortalidades causadas por *T. maritimum* en las poblaciones de peces vacunados y control. Con este fin se realizaron análisis bacteriológicos de los peces con signos de tenacibaculosis durante el período en estudio (6 meses).

Tabla 49.-Evaluación del efecto de la dosis de la vacuna monovalente Ictiovac-Tm en rodaballo.

Dosis vacuna/pez	Nº peces infectados	Cepa infección	Dosis infección estimada	Infección (Tiempo post-vacunación)
0,1 ml	50	<i>T.maritimum</i> (LL01 8.3.8)	0.1 ml	28 días
0,2 ml	50			
Control *	50			
Como control se utilizaron peces inyectados con solución salina.				

En este experimento se determinó también el efecto de la inmunización sobre la actividad estallido respiratorio de los granulocitos del riñón anterior y la respuesta inmune humoral específica transcurridos 5, 45, 60, 90 y 130 días tras la inmunización. Los resultados del ensayo de determinación del título de anticuerpos específicos mediante ELISA se expresaron como la media de los valores de la $DO_{492} \pm$ error estandar (EE). Los resultados del ensayo de la actividad respiratoria se expresaron como la media del índice de estimulación (IE) \pm Error Estándar (EE). Para cada muestra se analizaron en total 10.000 células. Con este fin se utilizaron 10 peces de cada grupo vacunado y el mismo número de peces control.

$$IE = \frac{\text{GMFI de leucocitos estimulados}}{\text{GMFI de leucocitos no estimulados}}$$

Experimento 2. Evaluación de la vacuna bivalente AVAC PEC *Aeromonas*/FM-95

En este ensayo se utilizaron un total de 3000 rodaballos, con un peso medio de $13,5 \pm 1$ g, para cada uno de las dosis de vacuna utilizada (0,08ml/pez, y 0,1 ml/pez) y el mismo número de peces para el grupo control.

Los peces se vacunaron mediante inyección intracelómica de la vacuna bivalente frente a la furunculosis y tenacibaculosis AVAC PEC *Aeromonas*/FM-95 (Tabla 48). Los rodaballos del grupo control se inyectaron con 0,1ml de solución salina. Los peces se mantuvieron en la piscifactoría de origen hasta su envío al animalario de la Facultad de Biología, para la realización de los ensayos *in vitro* e *in vivo*.

La eficacia de la inmunización se evaluó a los 30, 45 y 90 días post-vacunación mediante infección experimental, utilizando 50 peces inmunizados con cada una de las vacunas, 50 peces control y suspensiones en solución salina de las cepas bacterianas LL01 8.3.8 de *T. maritimum* e IAs06.1 de *A. salmonicida* ajustadas a una concentración de 10^9 UFC/ml (Tabla 50).

En este experimento se determinaron también el efecto de la inmunización sobre la actividad estallido respiratorio de los granulocitos del riñón anterior (transcurridos 15, 30, 45 y 180 días post-vacunación) (apartado 6.1.2.2) y las actividades lisozima (transcurridos 30, 45, 90 y 180 días post-vacunación) (apartado 6.1.2.3) y bactericida (transcurridos 15, 30, 45, 90 y 180 días post-vacunación) (apartado 4.1.2.3). Para el estudio de estas actividades se utilizaron 10 peces de cada grupo vacunado y 10 del grupo control para cada periodo ensayado.

Los resultados de la actividad respiratoria de los granulocitos se expresaron como índice de estimulación (IE) según se describió en el apartado anterior. Los resultados de la actividad bactericida se expresaron como índice bactericida (IB) definido como:

$$IB = \frac{A620 \text{ de la muestra tratada con suero}}{A620 \text{ del control negativo}}$$

Tabla 50.- Evaluación del efecto de la dosis en la eficacia de la vacuna bivalente AVACPEC *Aeromonas*/FM-95

Dosis vacuna/pez	Nº peces infectados	Cepa infección	Dosis infección estimada	Infección (Días post-vacunación)
0,08ml	50	<i>T. maritimum</i> (LL01 8.3.8)	10^9 UFC/ml	30, 45 y 90
	50	<i>A. salmonicida</i> (IAs 06.1)		
0,1ml	50	<i>T. maritimum</i> (LL01 8.3.8)		
	50	<i>A. salmonicida</i> (IAs 06.1)		
Control *	50	<i>T. maritimum</i> (LL01 8.3.8)		
	50	<i>A. salmonicida</i> (IAs 06.1)		

Como control se utilizaron peces inyectados con 0,1 ml de solución salina.

7.1.1.2.- Estudio del efecto de la ruta de administración de la vacuna

Se estudió el efecto que tiene la ruta de administración de la vacuna en el grado de protección alcanzado por los peces tras la inmunización. Con este fin se realizaron los experimentos que se describen a continuación:

Experimento 3. Evaluación de la vacuna monovalente Icthiovac-Tm

En este ensayo se utilizaron un total de 80 lenguados, con un peso medio de $5,5 \pm 1$ g, para cada una de las rutas de vacunación utilizadas (inyección intracelómica, inyección intramuscular e inyección en seno dorsal medio) y el mismo número de peces para el grupo control. Los peces se vacunaron con la vacuna monovalente anti-tenacibaculosis Icthiovac-Tm. Los lenguados del grupo control se inyectaron con 0,1 ml de solución salina (Tabla 51).

La eficacia de la inmunización se evaluó a los 45 días post-vacunación mediante infección experimental, utilizando 50 peces inmunizados con cada una de las vacunas, 50 peces control y una suspensión en solución salina de la cepa LL01.8.3.8 de *T. maritimum* ajustada a una concentración de 10^9 UFC/ml (Tabla 51).

En este experimento se determinó también el efecto de la inmunización sobre la actividad estallido respiratorio de los granulocitos del riñón anterior, transcurridos 7, 15 y 50 días tras la inmunización, utilizando 10 peces de cada una de las rutas de administración y 10 peces del grupo control para cada período analizado.

Experimento 4: Evaluación de la vacuna bivalente AVAC PEC FM-95/GAVA-3

En este ensayo se utilizaron rodaballos con pesos medios de 3 ± 1 g y 6 ± 1 g. y una vacuna bivalente frente a la vibriosis y tenacibaculosis AVAC PEC FM-95/GAVA-3. Los rodaballos de mayor tamaño (6g) se inmunizaron mediante inyección en la cavidad celómica, inyección intramuscular e inyección en el seno dorsal medio, utilizando 120 ejemplares para cada una de las vías evaluadas. Los rodaballos de 3 g se vacunaron mediante inmersión o baño corto, utilizando el mismo número de ejemplares (Tabla 51). Los rodaballos de los grupos control se trataron de la misma forma que los inmunizados empleando solución salina en lugar de vacuna.

La eficacia de la inmunización se evaluó, mediante infección experimental, transcurridos 90 días desde la primera inmunización. En el ensayo se utilizaron 50 rodaballos por cada una de las rutas de administración de las vacunas y patógeno evaluado y el mismo número de ejemplares del grupo control (Tabla 51). Los peces se inocularon con 0,1 ml de suspensiones en solución salina de la cepa LPV 1.7 de *T. maritimum* o con una mezcla de las cepas R82 y RG111 de *V. anguillarum* ajustadas a una concentración aproximada de 10^9 UFC/ml (escala McFarland) (Tabla 51). El efecto de la inmunización sobre la actividad estallido respiratorio de los granulocitos del riñón anterior y la respuesta inmune humoral específica se evaluó transcurridos 30 y 60 días tras la inmunización, utilizando 10 peces de cada uno de los grupos en estudio.

7.1.2.- Estudio del efecto de la temperatura del agua de cultivo

En este estudio se pretende determinar si la temperatura del agua del sistema de cultivo influye en el desarrollo de la respuesta inmune y en el grado de protección alcanzado por el rodaballo tras la inmunización.

Experimento 5. En este ensayo se utilizaron un total de 3000 rodaballos por grupo, con un peso de $13,5 \pm 1$ g, que se inmunizaron por vía intraperitoneal con una dosis de 0,1 ml/pez de la vacuna bivalente AVAC PEC *Aeromonas*/FM-95. Los peces inmunizados se mantuvieron durante el período de experimentación a $14 \pm 0,5^\circ\text{C}$ y $16 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Como control se utilizaron rodaballos inyectados con solución salina y mantenidos a $14 \pm 0,5^\circ\text{C}$ y $16 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (Tabla 52). Los peces se mantuvieron en la piscifactoría hasta el envío al animalario de la Facultad de Biología para la realización de los ensayos.

Tabla 51.- Efecto de la ruta de administración de las vacunas en la eficacia de la inmunización.

Experimento 3: Evaluación del efecto de la ruta con la vacuna TM en lenguado				
Vía de vacunación	Nº Peces	Cepa infección	Dosis infección estimada	Infección (Tiempo post-vacunación)
Lenguados de 5,5 gramos				
Inyección intracelómica	50	T. maritimum LL01.8.3.8	10 ⁹ UFC/ml	45 días
Inyección intramuscular	50			
Inyección en Seno Dorsal Medio	50			
Control no inmunizado	50			
Experimento 4: Evaluación del efecto de la ruta de vacunación con la vacuna AVAC PEC FM-95/GAVA-3 en rodaballo				
Vacuna	Nº Peces	Cepa infección	Dosis infección estimada	Infección (Tiempo post-vacunación)
Rodaballos de 3gramos				
Inmersión	50	T. maritimumLPV 1.7	10 ⁹ UFC/ml	90 días
	50	V. anguillarumR82 y RG111	10 ⁹ UFC/ml	
Rodaballos de 6 gramos				
Inyección intracelómica	50	T.maritimum LPV 1.7	10 ⁹ UFC/ml	90 días
	50			
Inyección intramuscular	50			
	50			
Inyección en seno dorsal Medio	50	V. anguillarum R82 y RG111	10 ⁹ UFC/ml	
	50			
Control no inmunizado	50			
	50			

La eficacia de la inmunización se evaluó a los 15 y 30 días post-vacunación mediante infección experimental, utilizando 50 peces por cada uno de los grupos de peces vacunados y control y suspensiones en solución salina de las cepas LPV 1.7 de *T. maritimum* e IAs06.1 de *A. salmonicida*, ajustadas a una concentración de 10⁹ UFC/ml.

El efecto de la inmunización sobre la actividad estallido respiratorio de los granulocitos del riñón anterior se evaluó transcurridos 15 y 30 días tras la inmunización, utilizando para cada ensayo 10 peces de los grupos vacunados y 10 peces control.

Para el estudio de la respuesta inmune humoral no específica se evaluó la actividad lisozima transcurridos 15 y 30 días tras la inmunización, utilizando 10 peces de cada uno de los grupos en estudio y período evaluado.

Tabla 52.- Evaluación del efecto de la temperatura del agua del sistema de cultivo en la eficacia de la inmunización.

Peces	Temperatura de mantenimiento	Nº Peces	Cepa infección	Dosis infección estimada	Infección (Tiempo post-vacunación)
Vacunados	14°C	50	<i>T. maritimum</i> LL01.8.3.8 (O1)	10 ⁹ UFC/ml	15 y 30 días
		50			
	16°C	50			
		50			
Control*	14°C	50	<i>A. salmonicida</i> IAs 06.1		
		50			
	16 °C	50			
		50			

Como peces control se utilizaron peces inyectados con solución salina.

7.1.3.-Análisis estadístico

Para determinar si existen diferencias significativas en los niveles relativos de supervivencia entre los peces vacunados y los peces control (no vacunados) se realizó un test de chi-cuadrado usando un nivel de significación de $p \leq 0,05$.

Los resultados de la actividad respiratoria de los granulocitos, las actividades lisozima y bactericida del suero y los niveles de anticuerpos de los peces control y vacunados se expresaron como la media \pm error estándar (EE) de los datos analizados y se compararon usando un ANOVA de una vía y el test de Bonferroni, utilizando el modelo de U de Mann-Whitney para comprobar la heterogeneidad de dos muestras ordinales. Los análisis se realizaron utilizando el programa IBM SPSS Statistics 22 y se consideró un nivel de confianza del 95% ($p \leq 0,05$).

7.2.- Resultados

7.2.1.- Influencia de factores inherentes a la estrategia de vacunación en la eficacia de la inmunización

En este estudio se han analizado el efecto de la dosis de vacuna administrada, de la vía de administración de la vacuna y de la temperatura de mantenimiento de los peces tras la inmunización, sobre el desarrollo y/o duración de la respuesta inmune protectora frente a *T. maritimum*, *A. salmonicida* y *V. anguillarum* en rodaballo y lenguado.

Con respecto al estudio del efecto de la dosis se realizó un primer experimento utilizando la vacuna monovalente anti-*T. maritimum* Ichthovac-Tm administrada en dosis de 0,1 ml/pez y 0,2 ml/en rodaballo (Experimento 1).

En los ensayos de laboratorio, el porcentaje relativo de supervivencia alcanzado por los peces inmunizados con la vacuna monovalente Ichthovac-Tm fue del 90% en los peces que recibieron 0,1ml de vacuna y del 97,3% en los peces vacunados con 0,2ml de vacuna (Tabla 53). No se han detectado diferencias significativas en el grado de protección frente a la flexibacteriosis alcanzado por los rodaballos en función de la dosis de vacuna administrada.

Los resultados de las pruebas de campo con la vacuna Icthiovac-Tm administrada en dosis de 0,1 ml y 0,2 ml se muestran en la Figura 45. Durante el período de tiempo analizado (seis meses) no se observaron diferencias significativas en la mortalidad acumulada en función de la dosis de vacuna y del tamaño de los peces.

Tabla 53.- Efecto de la dosis de la vacuna monovalente Icthiovac-Tm en rodaballo.

Infección (Tiempo post- vacunación)	Grupo de peces	Bacteria/dosis	% Mortalidad	RPS
28 días	Vacunados con 0,1 ml	LL01 8.3.8 1,0· x10 ⁹ UFC/ml	10	90
	Vacunados con 0,2 ml		2,7	97,3
	Control		100	
Porcentaje relativo de supervivencia (RPS)= 1- (%mortalidad en peces vacunados/% mortalidad en peces control) x100				

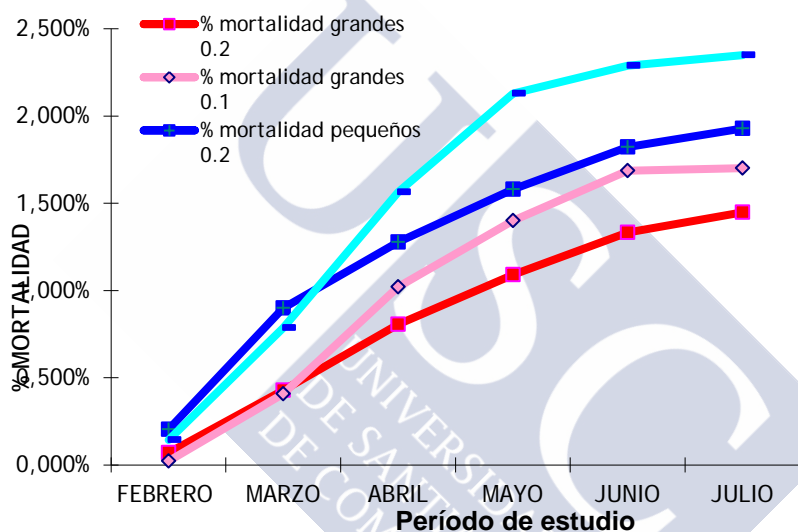


Figura 45.- Mortalidad acumulada en los peces inmunizados con la vacuna Icthiovac Tm (dosis de 0,1 y 0,2 ml) y mantenidos en condiciones de campo.

Los niveles de anticuerpos específicos frente a *T. maritimum* en el suero de peces vacunados con Icthiovac-Tm fueron siempre superiores a los observados en el suero de peces control durante todo el período analizado (5-130 días), independientemente de la talla de los peces y de la dosis de vacuna empleada (0,1 y 0,2 ml) (Figura 46). En el suero de todos los peces vacunados se detectaron anticuerpos específicos frente a *T. maritimum* a partir de los cinco días post-vacunación, alcanzándose los niveles más elevados a los noventa (peces pequeños) y a los cuarenta y cinco días (peces grandes), independientemente de la dosis de vacuna utilizada. Sólo en el suero de peces grandes inmunizados con 0,1 ml de vacuna se observaron niveles de anticuerpos específicos significativamente superiores ($p<0,05$) a los del control, transcurridos 45 días post-vacunación.

Los resultados del estudio de la respuesta inmune celular indican que, independientemente de la dosis de vacuna administrada y del tamaño de los peces inmunizados, se produce un aumento significativo de la actividad respiratoria de los granulocitos a los 5 y 130 días post-vacunación, produciéndose un descenso drástico y significativo de dichos índices entre los 45 y 90 días posteriores a la vacunación (Tabla 54).

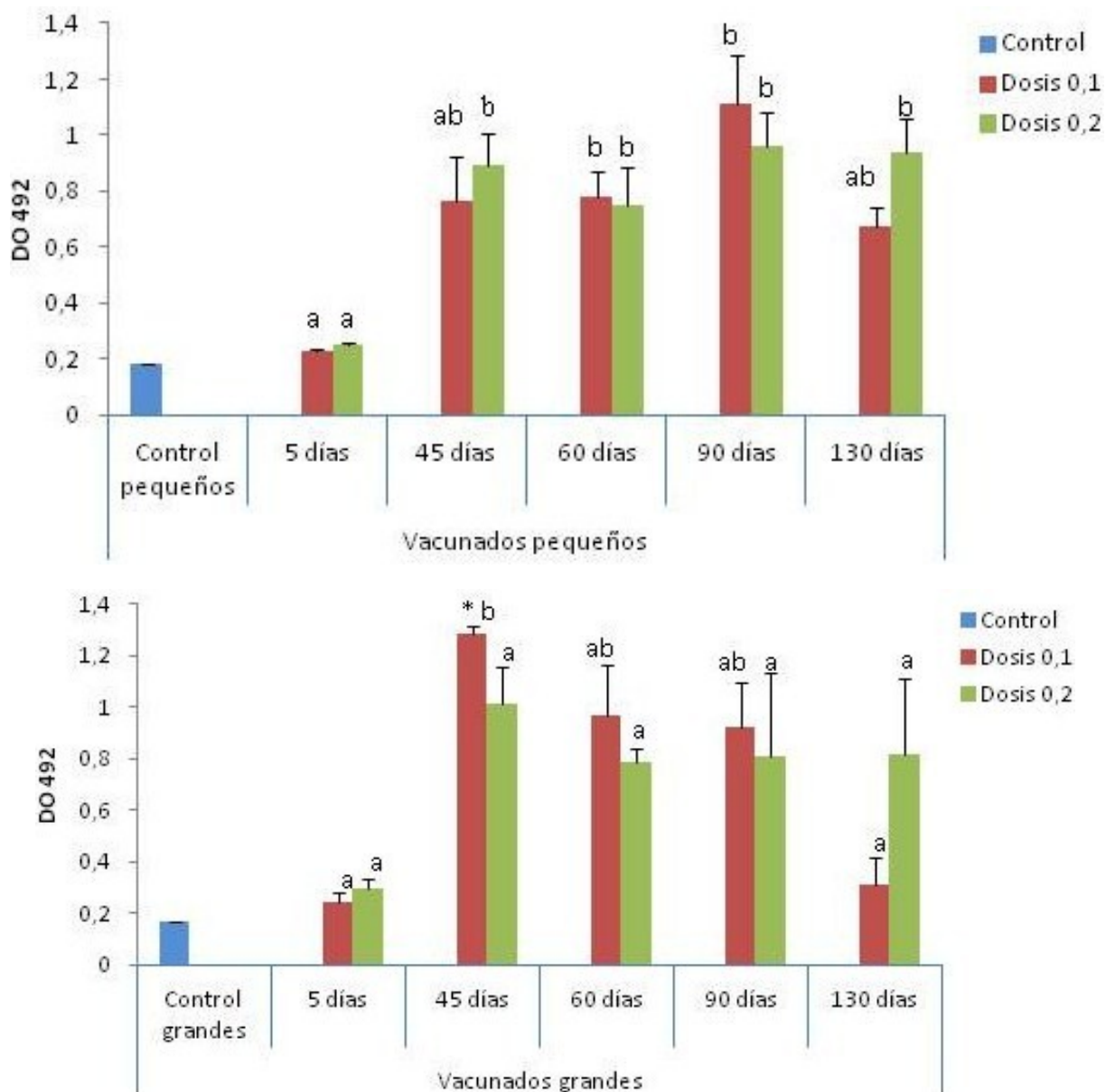


Figura 46.- Niveles de anticuerpos en peces del grupo control y peces des distintos pesos (100g= grandes y 70 g=pequeños) inmunizados con dos dosis (0,1ml y 0,2 ml) de la vacuna monovalentes anti-*T. maritimum* (Icthiovac-Tm). La existencia de diferencias estadísticas entre el mismo grupo a lo largo del tiempo se indica con diferentes letras, las letras en común indican que no hay diferencias significativas entre los puntos de muestreo. (P <0.05). * Indica diferencia significativa con el Control

Tabla 54.-Efecto de la dosis de vacuna sobre la actividad respiratoria de los granulocitos de riñón anterior de rodaballos inmunizados con la vacuna Icthiovac-Tm.

Peces pequeños						
Grupo	Nº Peces analizados	IE (Media± ES)				
		5días post-vacunación	45días post-vacunación	60 días post-vacunación	90días post-vacunación	130 días post-vacunación
Vacunados con 0,1 ml	5	174,9±8,5 ^a	6,5±2,80 ^b	1,6±0,72 ^b	7,1±4,5 ^{bc}	30,5±2,1 ^c
Vacunados con 0,2 ml	5	183±3,6 ^a	10,5±1,5 ^{bc}	7,6±2,2 ^b	6,5±2,6 ^b	31,7±4,7 ^c
Peces grandes						
Grupo	Nº Peces analizados	IE (Media± ES)				
		5días post-vacunación	45días post-vacunación	60 días post-vacunación	90 días post-vacunación	130 días post-vacunación
Vacunados con 0,1 ml	5	123±3,6 ^a	4,5±3,6 ^b	5,0±3,3 ^b	ND	45,5±16,2 ^c
Vacunados con 0,2 ml	5	ND	7,3±2,0 ^a	7,9±0,3 ^a	3,28±1,0 ^a	41,0±12,1 ^b
IE, Índice de estimulación = media geométrica de la intensidad de fluorescencia en leucocitos estimulados con PMA/media geométrica de la intensidad de fluorescencia en muestras no estimuladas. El valor se expresa como la media ± Error Estándar (EE). La existencia de diferencias estadísticas entre grupos a lo largo del tiempo se indica con diferentes letras, las letras en común indican que no hay diferencias significativas entre los puntos de muestreo. (P <0.05).						

Los peces vacunados con la vacuna bivalente (AVAC PEC *Aeromonas*/FM-95) (Experimento 2) mostraron niveles notables de protección frente a la flexibacteriosis causada por *T. maritimum* a los 90 días post-vacunación (RPS entre 66 a 87%), detectándose niveles de protección significativamente ($p<0,05$) más altos en los peces que recibieron la dosis de 0,1 ml de vacuna (Tabla 55). Los niveles de protección observados a los 30 (RPS entre 27 y 40%) y 45 días (RPS entre 19,5 y 36%) post-vacunación fueron más bajos. En contraste, cuando se evaluó la protección frente a *A. salmonicida* sólo se obtuvieron niveles elevados de protección (RPS entre 81 y 90%) transcurridos 30 días post-inmunización, observándose niveles relativamente bajos de protección frente a la furunculosis a partir de los 45 días (RPS=41%) y 90 días (RPS entre 11-22%).

Tabla 55.- Efecto de la dosis de la vacuna AVEC PEC *A. salmonicida*/FM95 en rodaballo

Infección (tiempo post-vacunación)	Grupo de peces	Bacteria/dosis	% Mortalidad	RPS
30 días	Vacunados 0,08 ml	LL01 8.3.8 8,0x10 ¹⁰ UFC/ml	29	40
	Vacunados 0,1 ml		35	27
	Control		48	
	Vacunados 0,08 ml	IAs 06.1 1,4x10 ⁹ UFC/ml	10	81
	Vacunados 0,1 ml		5	90
	Control		53	
45 días	Vacunados 0,08 ml	LL01 8.3.8 1,5x10 ¹² UFC/ml	53	36
	Vacunados 0,1 ml		67	19,5
	Control		83,3	
	Vacunados 0,08 ml	IAs 06.1 2x10 ⁹ UFC/ml	ND	ND
	Vacunados 0,1 ml		52	41
	Control		88	
90 días	Vacunados 0,08 ml	LL01 8.3.8 1x10 ¹⁰ UFC/ml	32	66*
	Vacunados 0,1 ml		12	87
	Control		96	
	Vacunados 0,08 ml	IAs 06.1 8,0x10 ⁹ UFC/ml	80	11
	Vacunados 0,1 ml		70	22
	Control		90	

Porcentaje relativo de supervivencia (RPS)= 1- (%mortalidad en peces vacunados/% mortalidad en peces control)x100. *Existen diferencias significativas entre la distinta dosis de vacuna para el mismo tiempo.

El estudio del efecto de la dosis de la vacuna bivalente AVAC PEC *A. salmonicida*/FM95 sobre la actividad respiratoria de los granulocitos del rodaballo reveló que no existen diferencias significativas entre los IE de los granulocitos de peces vacunados con las diferentes dosis de vacuna ni entre los IE de los granulocitos de peces vacunados y control a lo largo de todo el periodo estudiado (Tabla 56).

Tabla 56.- Actividad respiratoria de los granulocitos de riñón anterior de rodaballos inmunizados con diferentes dosis 0,1ml y 0,08ml.

Grupo de peces	Nº Peces analizados	IE (Media± ES)				
		Días Post-vacunación				
		15	30	45	90	180
Vacunados con 0,1 ml	10	12,0±1,0	21,8±1,8	1,1±0,0	1,5±0,2	19,9±13,4
Vacunados con 0,08 ml	10	8,5±3,5	8,75±2,1	15,0±1,6	2,0±0,7	17,6±0,4
Control	10	16,6±0,9	4,1±1,6	4,9±1,8	2,5±0,4	13,9±0,3

Índice de estimulación (IE)= media geométrica de la intensidad de fluorescencia en leucocitos estimulados con PMA/media geométrica de la intensidad de fluorescencia en muestras no estimuladas. El valor se expresa como la media ± Error Estándar (ES).

El análisis del suero de peces inmunizados con la vacuna bivalente AVAC PEC *A.salmonicida*/FM95 (dosis de 0,08 ml y de 0,1ml) demostró que la actividad lisozima se incrementa con respecto a los valores observados en peces control a partir de los 30 días post-vacunación, siendo este incremento significativamente ($p<0,05$) superior a partir de los 90 días post-vacunación (Figura 47). No se observaron diferencias significativas en la actividad lisozima del suero en función de la dosis de vacuna administrada.

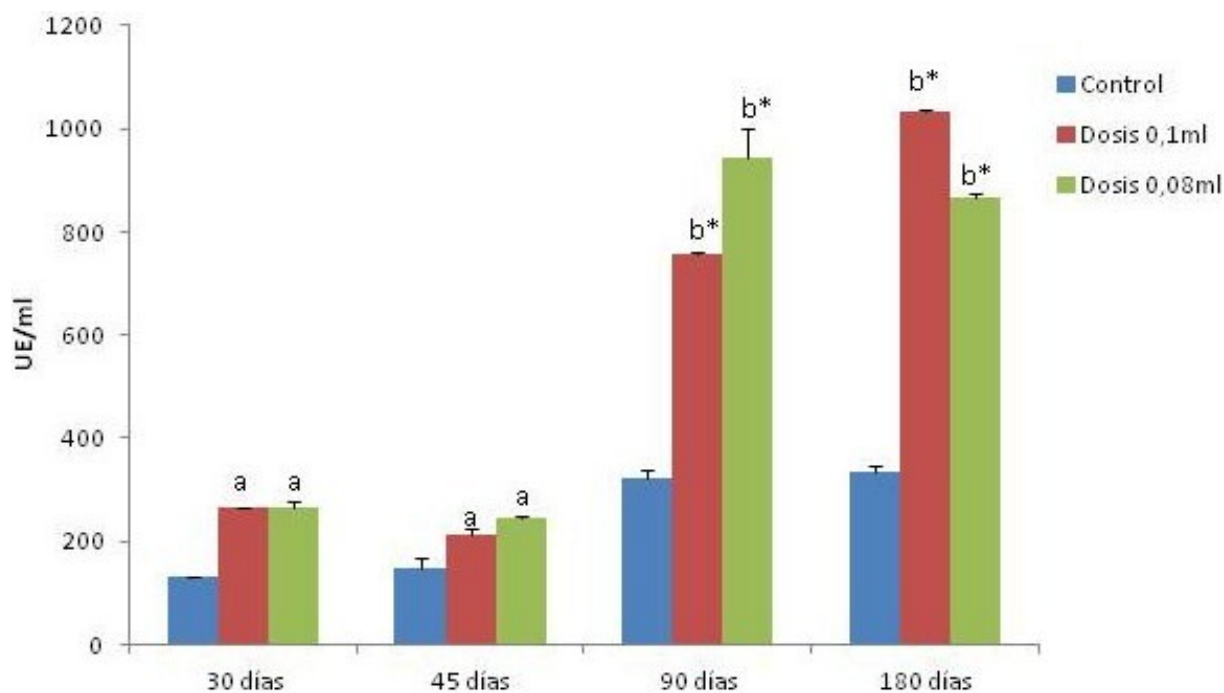


Figura 47.- Actividad lisozima en suero de rodaballos control y vacunados con la vacuna bivalente AVEC PEC *A.salmonicida* /FM95 (dosis de 0,08 ml y 0,1 ml). La existencia de diferencias estadísticas entre grupos a lo largo del tiempo se indica con diferentes letras, las letras en común indican que no hay diferencias significativas entre los puntos de muestreo. ($P < 0.05$). *Indica diferencias significativas entre control y vacunados para un tiempo determinado.

El estudio de la actividad bactericida del suero de los peces vacunados con la vacuna bivalente AVAC PEC *A. salmonicida*/FM95 (dosis de 0,08 ml y de 0,1ml) demostró que ésta se mantiene en valores similares o superiores a la del suero de los peces control hasta el día 50 post-vacunación, período a partir del cual se observó un descenso significativo ($p<0,05$), con independencia de la dosis de vacuna utilizada (Figura 48).

La ruta de administración de la vacuna y su influencia sobre la eficacia de la inmunización fue otro de los factores analizados en este estudio (Ellis, 1989) (Experimento 3 y 4). Con este fin, se llevó a cabo el experimento 3 de vacunación en lenguado, utilizando la vacuna monovalente frente a la tenacibaculosis Ichthiovac-Tm y el experimento 4 en rodaballo, utilizando la vacuna bivalente anti tenacibaculosis-vibriosis AVAC PEC FM95/GAVA-3.

Los ensayos de vacunación en lenguado (Experimento 3), demostraron que la administración de la vacuna mediante inyección en el seno dorsal medio (RPS= 51%) es el método más eficaz de inmunización (Tabla 57), no existiendo diferencias significativas ($P<0,05$) en cuanto a la eficacia con respecto a la inyección intramuscular o la inmersión. Los escasos niveles de protección observados en peces inmunizados por vía intracelómica pueden ser debidos a la imposibilidad de inocular la dosis de vacuna completa en los lenguados debido a la reducida capacidad de su cavidad celómica.

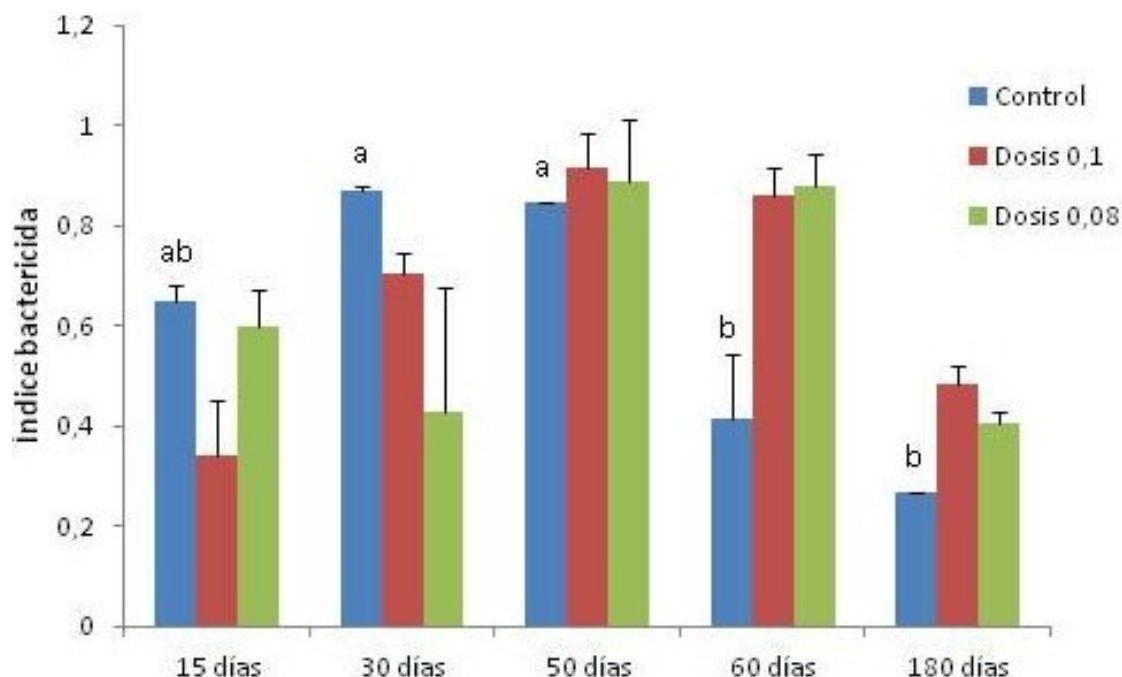


Figura 48.- Actividad bactericida en peces no inmunizados y vacunados con 0,08 ml y 0,1 ml de la vacuna bivalente AVEC PEC *A.salmonicida* /FM95 en rodaballo. La existencia de diferencias estadísticas entre grupos a lo largo del tiempo se indica con diferentes letras, las letras en común indican que no hay diferencias significativas entre los puntos de muestreo. ($P < 0.05$). * indica que existen diferencias significativas entre peces vacunados y peces control.

Tabla 57.- Efecto de la ruta de inmunización sobre el grado de protección (RPS) alcanzado por los lenguados vacunados con la vacuna monovalente Ichthovac-Tm en lenguado.

Infección (Tiempo post- vacunación)	Rutas de administración de la vacuna	Bacteria/dosis	% Mortalidad	RPS
45 días	Inyección Intramuscular (i.im)	LL 01.8.3.8 1×10^{10} UFC/ml	57	31
	Inyección seno dorsal medio (i.sdm)		41	51
	Inyección intracelómica (i.ic)		80	4
	Inmersión (inm)		49	40
	Control		83	

Porcentaje relativo de supervivencia (RPS)= $1 - (\% \text{mortalidad en peces vacunados} / \% \text{mortalidad en peces control}) \times 100$. La existencia de diferencias estadísticas entre grupos a lo largo del tiempo se indica con diferentes letras, las letras en común indican que no hay diferencias significativas entre los puntos de muestreo. ($P < 0.05$). * indica que existen diferencias significativas entre peces vacunados y peces control.

El estudio de la actividad respiratoria de los granulocitos del riñón cefálico demostró que siete días tras la vacunación sólo los peces inmunizados por inyección intramuscular presentan un grado de activación ($IE = 11,3$) superior al observado en los peces control ($IE = 6,3$) (Tabla 58). Transcurridos 15 días desde la inmunización las muestras de granulocitos provenientes de los peces inmunizados, independientemente de la vía de vacunación, no mostraron un incremento relevante en los índices de activación con respecto a los obtenidos con muestras de los peces control. Tan solo existe un incremento del grado de activación a los 50 días post-vacunación en los peces vacunados en el seno dorsal medio. No se observaron diferencias significativas en el índice de estimulación de los granulocitos de peces vacunados y control o entre los diferentes grupos de peces vacunados durante el período analizado (7, 15 y 50 días).

Tabla 58.- Efecto de la ruta de administración de la vacuna sobre la actividad respiratoria de los granulocitos de riñón anterior en lenguados inmunizados con la vacuna Icthiovac-Tm.

Grupo de peces	Nº Peces analizados	IE		
		Media± ES		
		7 días post-vacunación	15 días post-vacunación	50 días post-vacunación
Vacunados i.sdm	10	6,20±0	4,10±1	22,47±12
Vacunados i.c	10	7,82±3	4,43±2	ND
Vacunados i.m	10	11,30±0	10,15±2	2,24±0
Vacunados inm	10	7,90±0	ND	6,65±4
Control	10	6,31±1	9,38±5	14,95±9

Índice de estimulación (IE)= media geométrica de la intensidad de fluorescencia en leucocitos estimulados con PMA/media geométrica de la intensidad de fluorescencia en muestras no estimuladas. El valor se expresa como la media ± Error Estándar (EE).

En la Tabla 59 se muestran los resultados de la infección experimental para determinar el efecto de la ruta de inmunización sobre el grado de protección alcanzado por rodaballos vacunados con la vacuna bivalente AVAC PEC FM-95/GAVA 3. Se obtuvieron niveles moderados de protección (RPS entre 43,5 a 50) frente a la vibriosis en los peces vacunados por inyección (i.m, sdm e i.c), posiblemente debido al empleo de una dosis bacteriana demasiado elevada ($1,4 \times 10^{10}$ UFC/ml) para el tamaño de pez. El hecho de que la mortalidad en los peces vacunados por inyección fuese siempre significativamente ($p < 0,05$) inferior al de los peces control apoya esta hipótesis. Además, se obtuvieron niveles de protección significativamente bajos frente a la vibriosis (RPS=6%) o nulos frente a la tenacibaculosis (RPS=0%) ($p < 0,05$) cuando se utilizaba la vía de inmersión. Se obtuvieron resultados similares en el estudio de la eficacia frente a la tenacibaculosis.

Tabla 59.- Efecto de la ruta de inmunización sobre el grado de protección alcanzado por rodaballos vacunados con la vacuna bivalente AVAC PEC FM -95/GAVA 3.

Infección (Tiempo post-vacunación)	Grupos de peces	Bacteria/dosis	% Mortalidad	RPS
90 días	Vacunados i.m (6 g)	<i>V. anguillarum</i> R-82+RG-111 $1,4 \times 10^{10}$ UFC/ml	47	45%
	Vacunados i.sdm (6 g)		42	50%
	Vacunados i.c (6 g)		48	43,5%
	Vacunados inm (3 g)		80	6%
	Control		85	
	Vacunados i.m (6 g)	<i>T. maritimum</i> LL 01.8.3.8 $1,0 \times 10^{10}$ UFC/ml	38	62%
	Vacunados i.sdm (6 g)		33	67%
	Vacunados inm (3 g)		100	0%
	Control		100	

Porcentaje relativo de supervivencia (RPS)= $1 - (\% \text{mortalidad en peces vacunados} / \% \text{mortalidad en peces control}) \times 100$

Los resultados del ensayo de determinación de los niveles de anticuerpos en suero de peces inmunizados con la vacuna AVAC PEC FM -95/GAVA 3 administrada por inyección e inmersión se muestran en la Figura 49. En los dos períodos analizados (30 y 50 días post-vacunación) sólo los sueros de peces inmunizados por inyección en el seno dorsal medio mostraron niveles de anticuerpos frente a *T. maritimum* (AgCF LPV-1.7) superiores a los

observados en peces control. En contraste, en todos los peces vacunados se detectaron niveles de anticuerpos frente a *V. anguillarum* (mezcla de antígenos AgCF R-82 y AgCF RG-111) superiores a los observados en peces control (Figura 49).

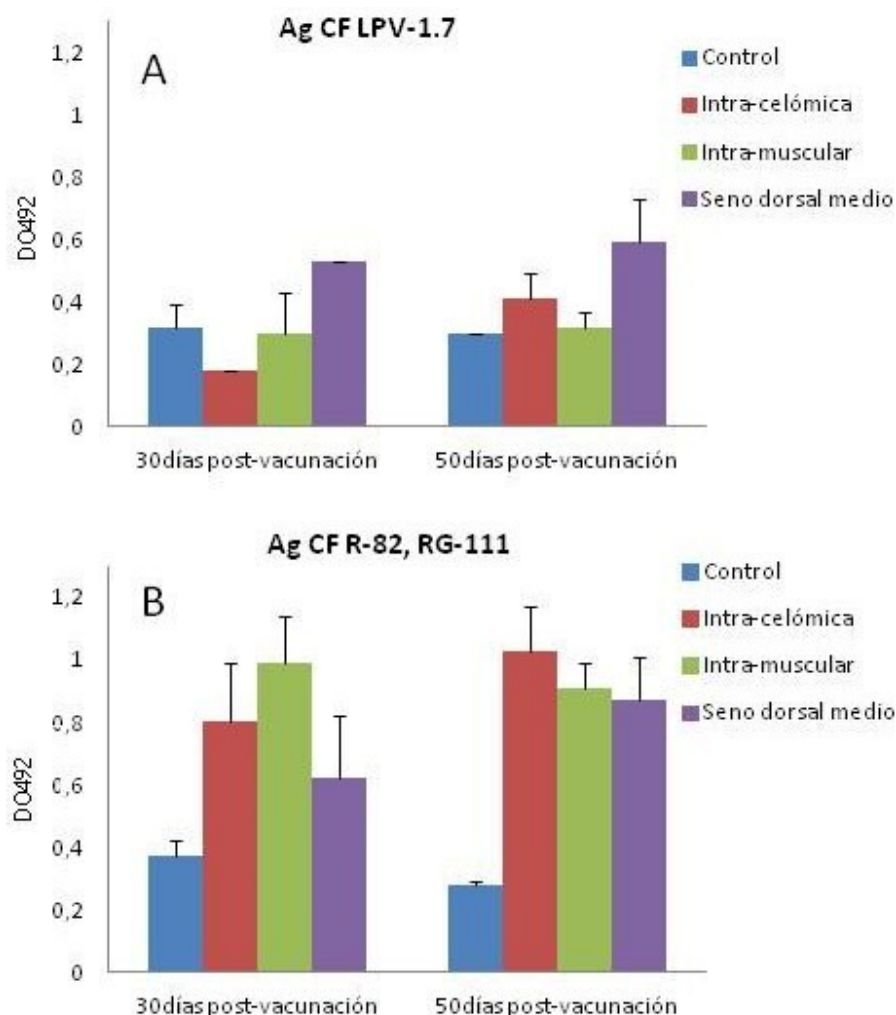


Figura 49.- Niveles de anticuerpos en peces del grupo control y peces inmunizados por distintas vías (intra-celómica, intra-muscular, y seno dorsal medio) de la vacuna bivalente AVAC PEC FM -95/GAVA 3. Para los antígenos AgCF LPV-1.7 (A) y para la mezcla de AgCF R-82 y AgCF RG-111 (B)

Los resultados del estudio de la actividad respiratoria de los granulocitos de los rodaballos vacunados por inyección (i.m, i.sdm e i.c) con la vacuna AVAC PEC FM95/GAVA-3 (Experimento 4) se muestran en la Tabla 60. No se han observado diferencias significativas en la actividad respiratoria de los granulocitos entre los grupos control y vacunados ni entre los peces inmunizados por diferentes vías.

Tabla 60.- Efecto de la ruta de inmunización sobre la actividad respiratoria de los granulocitos de riñón anterior alcanzado por los rodaballos vacunados con la vacuna bivalente AVAC PEC FM-95/GAVA 3.

Grupo de peces	Nº Peces analizados	IE Media± ES	
		30 días post--vacunación	50 días post-vacunación
Vacunados i.m	10	31,6±0	74,34±4,6
Vacunados i.sdm	10	12,8±8	51,6±6
Vacunados i.c	10	100,0±11,0	ND
Control	10	55,9±31	61,1±26

Índice de estimulación (IE)= media geométrica de la intensidad de fluorescencia en leucocitos estimulados con PMA/media geométrica de la intensidad de fluorescencia en muestras no estimuladas. El valor se expresa como la media ± Error Estándar (ES). ND; no determinado

7.2.2.- Efecto de la temperatura en la respuesta inmunitaria

En cuanto a los factores inherentes a la vacunación el último parámetro que se evaluó fue la influencia de la temperatura del agua en la eficacia de la inmunización con la vacuna FM-95- AVAC PEC *Aeromonas* (Experimento 5).

El cálculo del porcentaje relativo de supervivencia puso de manifiesto que los peces mantenidos a 16°C muestran niveles de protección frente a la tenacibaculosis y a la furunculosis significativamente superiores a los observados en peces mantenidos a 14°C (Tabla 61).

Tabla 61.-Efecto de la temperatura del agua en la eficacia de la vacunación con la vacuna FM-95- AVAC PEC *Aeromonas*

Tª	Infección experimental	Días post-vacunación	Infección experimental (UFC/ml)	RPS
14°C	<i>T. maritimum</i>	15 días	1,6x10 ¹¹ ufc/ml	23% ^b
	LL01 8.3.8	30 días	1,4x10 ¹¹ ufc/ml	9% ^a
	<i>A. salmonicida</i>	15 días	1,0x10 ¹¹ ufc/ml	0% ^a
	IAs 06.1	30 días	1,4x10 ¹¹ ufc/ml	0% ^a
16°C	<i>T. maritimum</i>	15 días	1,6x10 ¹¹ ufc/ml	50% ^{b*}
	LL01 8.3.8	30 días	2,4x10 ¹¹ ufc/ml	23,5% ^{b*}
	<i>A. salmonicida</i>	15 días	1,0x10 ¹¹ ufc/ml	50% ^{b*}
	IAs 06.1	30 días	4,9x10 ¹⁰ ufc/ml	47,4% ^{b*}

Porcentaje relativo de supervivencia (RPS)= 1- (%mortalidad en peces vacunados/% mortalidad en peces control) x100. La existencia de diferencias estadísticas entre grupos a lo largo del tiempo se indica con diferentes letras, las letras en común indican que no hay diferencias significativas entre los puntos de muestreo. (P <0.05). *Diferencias entre el grupo de peces vacunados a 14°C y el grupo de peces vacunados a 16°C.

Los resultados del estudio de la actividad respiratoria de los granulocitos de los rodaballos vacunados por la vacuna FM-95- AVAC PEC *Aeromonas* se muestran en la Tabla 62. Sólo se ha observado un incremento en la actividad respiratoria de los granulocitos de los peces vacunados mantenidos a 16°C a lo largo del período de estudio (15 y 30 días post-vacunación).

Tabla 62.- Efecto de la temperatura sobre la actividad respiratoria de los granulocitos de riñón anterior en rodaballos inmunizados con la vacuna FM95- AVAC PEC *Aeromonas*.

Grupo de peces	Nº Peces	IE a 14 °C	
		Media± ES	
		15 días post-vacunación	30 días post-vacunación
Control	10	240±41 ^{a*}	28,0±10 ^b
Vacunados	10	186±64 ^{a B}	19±16 ^{ba}

Grupo de peces	Nº Peces	IE a 16 °C	
		Media± ES	
		15 días post-vacunación	30 días post-vacunación
Control	10	97±5,2 ^{a*}	66,8±35 ^{a*}
Vacunados	10	176±10 ^{aB}	247±42 ^{aB}

IE, Índice de estimulación = media geométrica de la intensidad de fluorescencia en leucocitos estimulados con PMA/media geométrica de la intensidad de fluorescencia en muestras no estimuladas. La existencia de diferencias estadísticas entre grupos a lo largo del tiempo se indica con diferentes letras minúsculas. La existencia de diferencias estadísticas entre grupos de peces vacunados a 14 y a 16°C se indican con diferentes letras mayúsculas. Las letras en común indican que no hay diferencias significativas entre los tiempos de muestreo/grupos de peces. (P <0.05). *Existencia de diferencias significativas entre controles y vacunados.

Los resultados de la evaluación de la actividad lisozima del suero de rodaballos inmunizados con la vacuna FM95- AVAC PEC *Aeromonas* y mantenidos a 14 y 16°C se muestran en la Figura 51. La actividad lisozima del suero de los peces vacunados fue siempre superior a la observada en el suero de peces control, pero esta diferencia en actividad fue sólo significativa ($p \leq 0,05$) en el caso de los peces mantenidos a 16°C.

7.3.- Discusión

Las enfermedades infecciosas son uno de los principales factores limitantes para el desarrollo de la acuicultura. La prevención de los brotes de enfermedades es esencial para evitar pérdidas económicas graves y, por lo tanto, el desarrollo y/o perfeccionamiento de vacunas y estrategias de vacunación específicas para las especies de acuicultura es una necesidad imperiosa. Al igual que ocurre con otras vacunas veterinarias, una limitación esencial para el desarrollo de vacunas para acuicultura es la relación entre la eficacia en condiciones de campo y los costes. Los peces por lo general necesitan una dosis de antígeno grande en comparación con los animales terrestres por lo que los costos en vacunación son normalmente altos (Sommerset y col. 2005). Por ello, es esencial establecer cuál es la dosis necesaria y la vía idónea de administración de los antígenos para inducir una respuesta inmune protectora. Otro factor que puede influir en el desarrollo de la respuesta inmune y, por tanto, en la eficacia de la vacunación es la temperatura del agua de cultivo (Sommerset, 2005).

Por todo ello, en el presente estudio se han evaluado la influencia de parámetros relacionados con la administración de las vacunas (dosis y vías) y factores ambientales en el desarrollo de la respuesta inmune de los peces, con el fin de desarrollar estrategias de vacunación más eficaces y adaptadas a las especies de peces en cultivo.

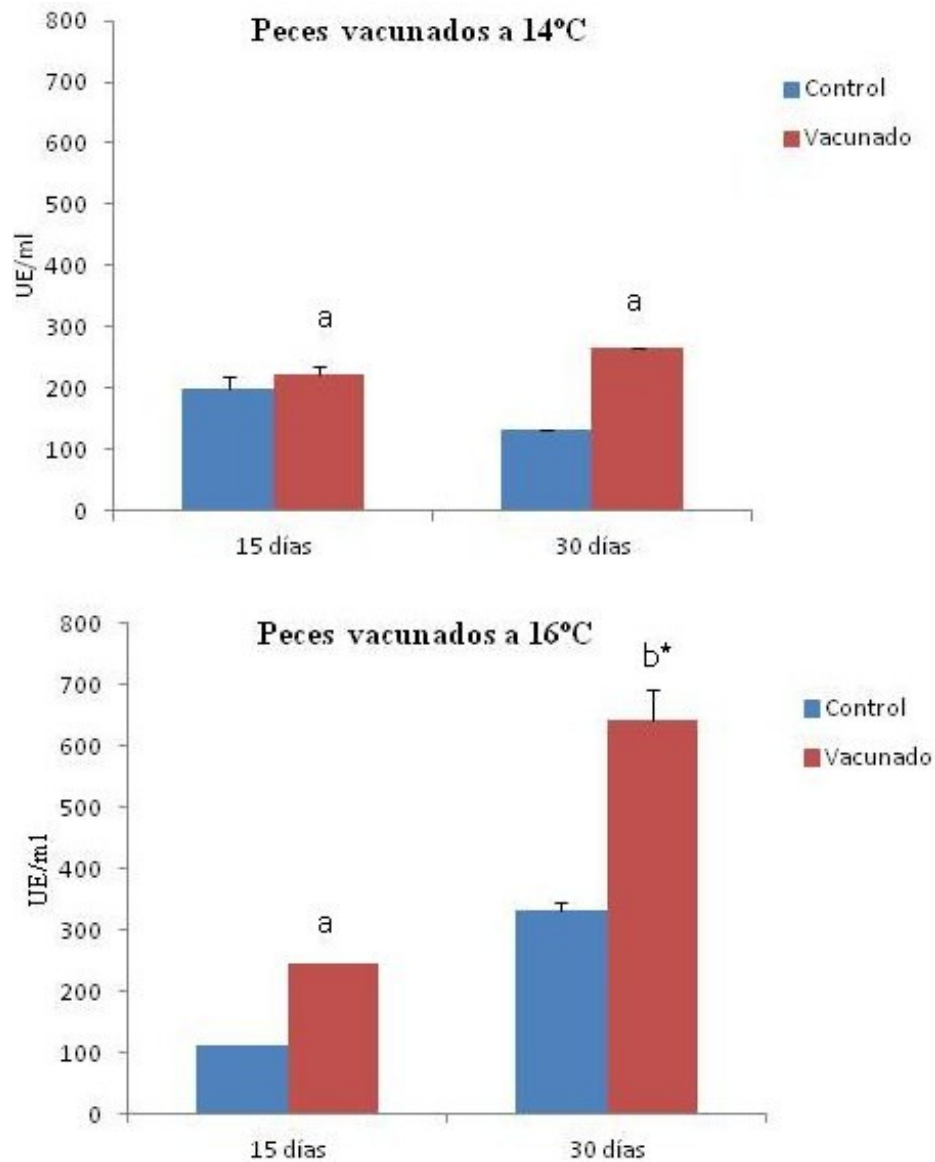


Figura 50.- Actividad lisozima en el suero de rodaballos inmunizados con la vacuna FM95- AVAC PEC *Aeromonas* y mantenidos a 14 y 16°C. La existencia de diferencias estadísticas entre grupos a lo largo del tiempo se indica con diferentes letras, las letras en común indican que no hay diferencias significativas entre los puntos de muestreo. ($P < 0.05$). * indica que hay diferencia significativa entre distintas temperaturas.

El efecto de la dosis se evaluó en rodaballo utilizando la vacuna monovalente anti-*T. maritimum* Icthiovac-Tm administrada en dosis de 0,1 ml/pez y 0,2 ml/pez, y la vacuna bivalente AVAC PEC *Aeromonas*/FM-95 administrada en dosis de 0,08 ml y 0,1 ml.

Los resultados obtenidos indicaron que, con independencia de la dosis de vacuna utilizada, no existen diferencias significativas en cuanto a la eficacia de la inmunización a nivel de supervivencia de los peces (ensayos de laboratorio y campo con la vacuna Icthiovac TM y ensayos de laboratorio con la vacuna bivalente AVAC PEC *Aeromonas*/FM-95), respuesta inmune celular (valorada en base a la actividad estallido estallido respiratorio de los granulocitos) y humoral no específica (actividad lisozima y bactericida del suero) y específica (título de anticuerpos específicos). Estos resultados sugieren que la dosis de 0,1 ml puede ser considerada como óptima en procesos de inmunización del rodaballo frente a la tenacibaculosis y furunculosis, lo que representaría un considerable ahorro en los costes destinados al control sanitario de estas patologías en las granjas de cultivo.

Por otra parte, se observó que los sueros de peces vacunados con la vacuna bivalente AVAC PEC *Aeromonas*/FM-95 muestran valores de actividad lisozima superiores a los observados en peces control, siendo estas diferencias significativas a partir de los 90 días post-inmunización. Estos resultados concuerdan con otros estudios en los cuales se refleja que la inmunización con bacterinas frente a *A. salmonicida* (Ackerman y col., 2000), la administración de inmunoestimulantes (Santarém y col., 1997; Villamil y col., 2003) y adyuvantes (Chen y col., 1998) o la inoculación de productos extracelulares bacterianos (ECPs) de *Mycobacterium* spp. (Chen y col., 1998) inducen una alta actividad lisozima.

La ruta de inmunización elegida es fundamental a la hora de estimular una respuesta inmune protectora frente a las bacterias patógenas (Ellis, 1989; Penagos, 2009). Estudios previos en Tilapia (Silva y col., 2009) indican que la ruta de administración de las vacunas puede condicionar el tipo de respuesta inmunológica y hematológica. En el presente estudio se ha evaluado la influencia de la ruta de vacunación con dos especies diferentes, rodaballo y lenguado. En los ensayos de vacunación en lenguado se utilizó la vacuna monovalente anti-tenacibaculosis Icthiovac-Tm y en rodaballo la vacuna bivalente anti tenacibaculosis-vibriosis AVAC PEC FM95/GAVA-3, empleando cuatro vías de inmunización (inyección intramuscular, inyección en seno dorsal medio, inyección intracelómica e inmersión). En ambos ensayos se observó que la vacunación por inyección en el seno dorsal medio es el método de vacunación más eficaz.

Un hecho sorprendente fue el bajísimo nivel de protección observado en los lenguados inmunizados por vía celómica tan solo un valor de RPS de 4%. Estos resultados podrían ser debidos a limitaciones anatómicas inherentes a la especie y/o talla de pez (5,5 g) utilizada en el estudio y que imposibilitan la retención en su cavidad celómica de dosis de vacuna iguales o superiores a 0,1 ml. Según Penagos (2009), el rango mínimo de peso recomendado para la administración intraperitoneal de vacunas es de 15 g de peso. Asimismo, Evans y col. (2004) demostraron que en el caso de tilapias la respuesta inmune es notablemente menor en peces de 5 g respecto a los de 30 g, independientemente de la vía de inmunización.

Además, se obtuvieron niveles de protección significativamente bajos frente a la vibriosis o nulos frente a la tenacibaculosis cuando se utilizaba la vía de inmersión como método de inmunización. Evans y col (2004) obtuvieron resultados similares en tilapia utilizando una vacuna elaborada con células y productos extracelulares inactivados con formaldehído de la bacteria *Streptococcus agalactiae*. Estos resultados podrían deberse a la baja absorción de antígenos por parte de los peces (Bader y col., 1997; Grabowski y col., 2004) o al hecho de que, al utilizar la vía intracelómica en la infección experimental de peces vacunados por inmersión, se estaría obviando la barrera de protección que representan la piel

y el moco que recubre la superficie corporal del pez (Secombes y Olivier, 1997; Evans y col. 2004; Magnadóttir, 2006). Estas variaciones en la resistencia de los peces a desarrollar la enfermedad en función de la vía de infección puede reflejar la existencia de diferencias cualitativas y/o cuantitativas en los componentes de protección presentes en el moco y suero (Maki y Dickerson, 2003; Magnadóttir, 2006).

Con respecto al resto de los parámetros evaluados, los niveles de anticuerpo específicos frente a *T. maritimum* y *V. anguillarum* en el suero de peces vacunados fueron superiores a los observados en peces control, siendo estos valores más elevados en los peces inmunizados mediante inyección en el seno dorsal medio. Estos resultados concuerdan con los descritos por otros investigadores (Secombes, 1994, Kitlen y col., 1997; Villamil y col. 2002), y confirman la existencia de correlación entre grado de protección alcanzado por los peces y la respuesta inmune humoral específica.

El último factor evaluado en este capítulo fue la influencia de un factor ambiental, la temperatura del agua, en la eficacia de la vacunación con la vacuna bivalente FM-95- AVAC PEC *Aeromonas*. Estudios previos indican que éste factor afecta a la mayoría de los aspectos de la fisiología de los peces, incluyendo la adquisición de la inmunidad, por lo que se debe tener en cuenta a la hora de establecer estrategias en caminadas a estimular el desarrollo de la respuesta inmune contra el patógeno (Ellis, 1989; BlyL. 1992; Ferguson, 2006). El efecto de la temperatura ambiental en el sistema inmune de teleósteos varía en función de la duración y magnitud del cambio de temperatura y de las especies de peces, pero, en general, las temperaturas más bajas conducen a una parada o ralentización reversible de los mecanismos de respuesta inmunitaria (Abram y col., 2017).

En el presente estudio se ha evaluado el efecto de la temperatura en el desarrollo de la respuesta inmune protectora frente a los patógenos *T. maritimum* y *A. salmonicida* en rodaballo inmunizados con la vacuna bivalente FM-95- AVAC PEC *Aeromonas*, así como el efecto de este factor ambiental sobre parámetros del sistema inmune innato y adaptativo. Las temperaturas que se seleccionaron para este ensayo fueron 14 y 16°C, que son las que se suelen alcanzar en la zona de ubicación de la piscifactoría donde se realizó el estudio, y por tanto, las interesantes a nivel comercial. Además, dado que las granjas de rodaballo son instalaciones en tierra con bombeo continuo de agua (Svåsand et al., 2004), el mantenimiento de temperaturas más altas en los tanques de producción supondría un coste excesivo y no asumible.

El porcentaje relativo de supervivencia, la actividad lisozima del suero y la actividad estallido respiratorio de los granulocitos de los peces vacunados y mantenidos a 16°C fue superior a la de los peces mantenidos a 14°C. Aunque en este ensayo no se han determinado los niveles de anticuerpos específicos, estudios realizados en trucha arcoíris vacunadas con una bacterina frente a *Yersinia ruckeri* han revelado que la respuesta inmune humoral específica se reduce considerablemente a bajas temperaturas (Raida and Buchmann (2007), con valores mínimos a 5°C con respecto a 15°C y 25°C. En consecuencia, dependiendo de la temperatura del agua, la vacunación debe realizarse dentro de un período de tiempo mínimo antes de que los peces puedan sufrir una exposición a patógenos con el fin de evitar el riesgo de aparición de epizootias.



8.- DISCUSIÓN GENERAL

La acuicultura es en la actualidad uno de los sectores de producción animal con mayor desarrollo y potencial de crecimiento a nivel mundial (FAO, 2014). La intensificación de la industria acuícola y la diversificación de las especies en cultivo se ha visto acompañada de la aparición de enfermedades infecciosas (Santos, 2005; Toranzo y col., 2005), que causan pérdidas económicas significativas para la industria. Las enfermedades infecciosas de etiología bacteriana son las principales responsables de problemas patológicos que afectan a las poblaciones de peces en cultivo (Santos, 2005; Toranzo y col., 2005). La prevención y el control de las patologías son por ello una de las prioridades para el mantenimiento y el progreso del sector. El desarrollo y establecimiento de métodos eficaces de prevención y control de enfermedades infecciosas en acuicultura requiere la identificación de los agentes etiológicos que afectan a los peces cultivados, la instauración de buenas prácticas de manejo, una nutrición adecuada y el establecimiento de medidas profilácticas basadas en la vacunación (Gudding y col., 2014).

En consecuencia el primer aspecto abordado en este trabajo fue la identificación de las principales especies bacterianas asociadas a mortalidades en las granjas de cultivo de rodaballo y lenguado de Galicia.

En contraste con lo descrito para especies de peces cultivados en otras áreas geográficas (Zorrilla y col., 2003; Toranzo y col., 2005), el microorganismo aislado con mayor frecuencia a partir de rodaballos y lenguados enfermos en piscifactorías de Galicia fue *Tenacibaculum maritimum* sólo o en asociación con miembros del género *Vibrio* (*V. splendidus*, *V. pelagius*, *V. harveyi* y *V. alginolyticus*). Los principales serotipos de *T. maritimum* causantes de tenacibaculosis fueron el O1 y el O2 en lenguado y el O1 y el O3 en rodaballo. El serotipo O1 también ha sido descrito como el principal agente de tenacibaculosis en diferentes especies de peces marinos por Fernández-Álvarez y col., (2018).

A. salmonicida subsp. *salmonicida*, el agente etiológico de la furunculosis clásica, sólo fue detectada en alguna de las instalaciones dedicadas al cultivo de rodaballo a lo largo del período en estudio (2002 al 2007). Esta bacteria ha sido descrita como agente causal de furunculosis en lenguados mantenidos con el mismo sistema de recirculación de agua empleado para los rodaballos (Magariños y col. 2011), poniendo de manifiesto la necesidad de un análisis previo de la susceptibilidad a enfermedades de las especies que se pretendan mantener en co-cultivo. El aislamiento en el presente estudio de *V. anguillarum* y *P. damsela* subsp. *piscicida* a partir de muestras de lenguados enfermos mantenidos en co cultivo con doradas, refuerza la necesidad de este tipo de estudios, particularmente cuando se pretenden introducir nuevas especies de peces en una instalación.

Con el fin de valorar el riesgo potencial para los cultivos de rodaballo y lenguado de las especies bacterianas aisladas con mayor frecuencia durante el presente estudio, se realizaron infecciones experimentales utilizando ambas especies de peces como modelo experimental y cepas representativas de *T. maritimum*, *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, *P. damsela* subsp. *piscicida*, *V. anguillarum*, *V. splendidus*, *V. pelagius* y *V. alginolyticus*. Los resultados obtenidos indican que, excepto *V. alginolyticus*, todas las cepas de las especies analizadas eran virulentas y producían mortalidad al ser inoculadas por vía intramuscular en juveniles de rodaballo y lenguado, confirmando su potencial patógeno para ambas especies de peces.

El estudio de parámetros hematológicos e inmunológicos de los peces se ha incrementado notablemente en los últimos años con el fin de buscar marcadores útiles de estrés y/o enfermedad. Además, el conocimiento del sistema inmune de los peces es básico para el desarrollo de métodos de prevención de las enfermedades (Blaxhall, 1972; Rehulka, 2002; Martins y col. 2004; Failde y col., 2013; 2014; Coscelli, 2014). Por ello, se necesitan técnicas rápidas, sensibles y no cruentas que permitan obtener información fiable sobre el estado de salud de los peces y que puedan ser utilizadas como alternativa al uso de animales de experimentación para valorar la respuesta del sistema inmunitario de los peces tras la administración de vacunas. Con el fin de disponer de métodos analíticos apropiados para valorar el efecto de la infección y de la vacunación sobre el sistema inmunitario del rodaballo y lenguado, en el presente estudio se han optimizado técnicas basadas en espectrofotometría y en citometría de flujo para el análisis de parámetros hematológicos y del sistema inmune innato humoral y celular.

En este estudio se ha demostrado que la infección experimental con *T. maritimum* produce un leve descenso del hematocrito. Estos resultados concuerdan con los descritos en infecciones experimentales con otras bacterias patógenas como *Enterococcus* sp. (Martins y col., 2008), *Streptococcus iniae* (Chen y col., 2004), *Vibrio anguillarum* (Harbell y col., 1979) y *Aeromonas* spp. (Brenden and Huizinga, 1986; Harikrishnan y col., 2003), en los que la reducción del hematocrito se asocia con la anemia producida por las hemorragias o por la destrucción de eritrocitos debido a la acción de las hemolisinas bacterianas. De hecho, estudios previos indican que *T. maritimum* produce hemolisinas con capacidad para lisar eritrocitos de diferentes especies de peces y animales homeotermos (Pazos 1997) y que la inoculación en peces de las hemolisinas purificadas a partir de los productos extracelulares de la bacteria producen mortalidad.

En cuanto al estudio de las poblaciones celulares, se han observado variaciones en la proporción de linfocitos y granulocitos tras la infección experimental con *T. maritimum*, lo que sugiere una activación de la inmunidad innata (Clem y col., 1985; Secombes, 1994; Van Muiswinkel 1995; Pathiratne y Rajapakshe, 1998). En estudio previos en salmón Atlántico se han descrito cambios en la composición de leucocitos después de la vacunación de los peces con una vacuna viva frente a *Cryptobia salmositica* (Chin y col. 2005).

La lisozima es una molécula de defensa del sistema inmunológico innato, que desempeña un importante papel en la protección contra la invasión microbiana gracias a su actividad lítica contra las bacterias (Saurabh y Sahoo, 2008). En el presente estudio se observó que la actividad lisozima del suero de peces infectados con *T. maritimum* se incrementaba significativamente con respecto a los valores observados en el suero de peces control, indicando la importancia de la lisozima en el control de la infección causada por esta bacteria. También se observó un incremento en la actividad de esta enzima tras la inmunización de los peces con vacunas mono y bivalentes frente a la tenacibaculosis, vibriosis y furunculosis. Estos resultados concuerdan con estudios previos en los cuales la administración de bacterinas e inmunostimulantes (Santarém y col, 1997), bacterias y productos extracelulares bacterianos (ECPs) producían un incremento de la actividad lisozima del suero de trucha arcoiris (Ackerman y col. 2000, Skov y col., 2012), tilapia del Nilo (Chen y col., 1998) y carpas infectadas con *Aeromonas punctata* (Siwicki y Studnicka, 1987), salmón atlántico infectado experimentalmente con *A. salmonicida* (Moynier y col. 1993) o rodaballo infectado con *Vibrio pelagius* (Villamil y col., 2003) o con *Mycobacterium* spp. (Chen y col., 1998).

Con respecto a la respuesta inmune humoral específica, no se han observado diferencias significativas entre los niveles de anticuerpos específicos entre peces control y vacunados, lo que sugiere que, además de los anticuerpos, otros componentes humorales o celulares pueden ser responsables de la respuesta inmune protectora frente a *T. maritimum* en rodaballo.

El principal componente de la inmunidad innata celular lo constituyen los macrófagos, que aparecen de manera temprana en las inflamaciones y en muchos casos sirven de vehículo a los patógenos para llegar a diferentes órganos y evitar ser destruidos (Penagos, 2009; Pulido, 2004). En el presente estudio se ha observado que los macrófagos de peces infectados con *T. maritimum* muestran un grado de activación similar o inferior a los observados en peces control, lo cual sugiere que estos microorganismos podrían tener capacidad para sobrevivir en el interior de los macrófagos inhibiendo o eludiendo el estallido oxidativo. La capacidad de supervivencia en el interior de los macrófagos ha sido ya descrita en otras bacterias patógenas de peces como *Renibacterium salmoninarum* (Campos-Pérez y col., 1997) y *Aeromonas salmonicida* (Stave y col., 1985; Sakai y col., 1993; Barnes y col., 1999; Boesen y col., 2001).

Tampoco se observaron incrementos en la actividad estallido respiratorio tras la inmunización con vacunas monovalentes anti-tenacibaculosis y con vacunas bivalentes anti-tenacibaculosis-vibriosis o anti-tenacibaculosis-furunculosis. Estos resultados unidos a la falta de una potente respuesta inmune específica sugieren que alguno de los antígenos presentes en las bacterinas pueden actuar reduciendo la respuesta inmune. Un efecto similar se ha observado cuando se administran a peces salmónidos vacunas anti *R. salmoninarum* que contiene la proteína P57 (Sakai y col., 1993b).

En el estudio del efecto de los parámetros relacionados con la producción (lote y estabilidad de lote) se empleó una vacuna acuosa (FM-95) frente al serotipo O2 de *T. maritimum*. Los resultados obtenidos demostraron que el lote de producción y el tiempo transcurrido tras la producción de la vacuna (0 a 27 meses) no afectan a la eficacia de la vacunación valorada mediante la realización de ensayos *in vivo* (infecciones experimentales) e *in vitro* (determinación del título de anticuerpos y de la actividad estallido respiratorio de los macrófagos renales). Así, se ha demostrado que los rodaballos inmunizados por inyección con los tres lotes de la vacuna FM-95 muestran niveles de protección elevados (rango de RPS= 80-100%) que se mantienen transcurridos seis meses después de la vacunación (RPS= 68-82%) cuando se utiliza la vía de inyección para la realización del reto infeccioso. Estos resultados contrastan con los descritos en salmón atlántico por van Gelderen y col., (2009) quienes, tras la realización de un reto infeccioso por baño, observaron niveles de supervivencia (RPS) del 28% o superiores al 70% transcurridos 27 días desde la inmunización de los peces con una vacuna acuosa o con una vacuna con el adyuvante oleoso incompleto de Freund, respectivamente. Las divergencias observadas entre ambos estudios pueden atribuirse al uso de diferentes especies de pez como modelo experimental y de diferentes vacunas así como de distintas cepas bacterianas y rutas de infección. En base a todos estos datos se podría considerar que la vacuna acuosa monovalente frente a *T. maritimum* FM-95 es estable y eficaz y podría ser utilizada para la prevención de la tenacibaculosis en rodaballo.

Estudios sobre la variabilidad antigénica de la especie *T. maritimum* (Pazos, 1997; Santos y col., 1999; Toranzo y col., 2005; Avendaño-Herrera y col. 2006; Castro y col., 2007) sugieren que la inclusión de antígenos de cepas representativas de los principales serotipos asociados a mortalidades en peces podría mejorar la eficacia de la actual vacuna frente a la tenacibaculosis compuesta por antígenos de la cepa LPV1.7 (serotipo O2) (Pazos 1997, Santos y col., 1999). Con el fin de valorar esta posibilidad se evaluaron en primer lugar

vacunas anti-tenacibaculosis marina elaboradas con una cepa de *T. maritimum* del serotipo O2 (vacuna FM-95) o con tres cepas de *T. maritimum* de los serotipos O1, O2 y O3 (vacuna TM-3) en rodaballo. Los resultados obtenidos indican que, aunque no existe competencia antigénica, la inmunización de los peces con la vacuna TM-3 no incrementa los niveles de eficacia con respecto a los obtenidos con la vacuna monovalente FM-95.

Como los serotipos de *T. maritimum* que afectan a las especies de salmónidos y de peces marinos (rodaballo, la lubina, el besugo y el lenguado) pueden ser diferentes (Pazos, 1997; Santos y col, 1999; Avendaño-Herrera y col, 2006) las vacunas diseñadas para una especie de pez no deberían ser utilizadas para otras especies sin una evaluación previa de su eficacia. Con el fin de esclarecer este aspecto en el presente estudio se determinó el grado de protección alcanzado por lenguados inmunizados con las vacunas monovalentes FM-95 (LPV1.7 del serotipo O2, aislada de rodaballo) y TM-1 (LL01 8.3.8 del serotipo O1, aislada de lenguado). Los resultados de la infección experimental demostraron que ambas vacunas confirieron niveles elevados de protección (RPS superiores al 85%) frente a la tenacibaculosis al lenguado. Estos resultados sugieren que el uso de vacunas monovalentes anti-*T. maritimum* formuladas con antígenos de una cepa virulenta representativa de uno de los serotipos patógenos de esta especie bacteriana puede ser de utilidad en la prevención de la tenacibaculosis en ambas especies de peces. Estos resultados contrastan con los publicados para las vacunas frente a la vibriosis causada por *V. anguillarum* en bacalao (Mikkensel y col. 2011) y rodaballo (Santos y col, 1991) en los que las vacunas monovalentes (compuestas por antígenos de un solo serotipo o subgrupo serológico) conferían niveles de protección inferiores a los obtenidos con las vacunas trivalentes (compuestas por antígenos de varios serotipos y/o subgrupos serológicos).

Existen evidencias de que los antígenos y otros componentes de las vacunas pueden interactuar de forma sinérgica o antagónica y pueden estimular, reaccionar de forma cruzada, inhibir o incluso suprimir la respuesta inmune a antígenos específicos (Busch, 1997). Se debe conocer el efecto sobre el sistema inmune de los peces de la administración de vacunas combinadas o polivalentes o de la administración secuencial de vacunas (Greger y Goodrich, 1999; Santos, 2005; Toranzo y col., 2005; 2009), debido a la posibilidad de que se produzcan fenómenos de competencia antigénica. A la vista de los resultados obtenidos en el presente estudio con las vacunas combinadas AVAC PEC *Aeromonas*/FM-95 y AVAC PEC FM-95/GAVA-3, podemos afirmar que no presentan efectos antagónicos y que se podrían utilizar vacunas divalentes en una sola dosis para inmunizar a los peces frente a la furunculosis-tenacibaculosis y frente a la vibriosis-tenacibaculosis, reduciéndose los costes de manipulación para la granja, además de minimizar el estrés provocado a los peces durante los procesos de inmunización. Estudios previos han demostrado la efectividad de vacunas divalentes contra la vibriosis causada por *V. anguillarum* y la fotobacteriosis producida por *P. damsela subsp. piscicida* en dorada (Moriñigo y col. 2002) y lubina (Gravningen, 1998).

Por último, se han evaluado la influencia de parámetros relacionados con la administración de las vacunas (dosis y vías) y factores ambientales en el desarrollo de la respuesta inmune de los peces, con el fin de desarrollar estrategias de vacunación más eficaces y adaptadas a las especies en cultivo. Los resultados obtenidos permiten concluir que la administración mediante inyección de vacunas (mono o bivalentes en dosis de 0,1 ml confiere niveles notables de protección frente a la furunculosis, tenacibaculosis y vibriosis en rodaballo y que la temperatura del agua es determinante en el desarrollo de la respuesta inmunitaria.

9.- CONCLUSIONES

1. La especie bacteriana aislada con mayor frecuencia a partir de rodaballo y lenguado cultivados en piscifactorías de Galicia durante el período en estudio (2002-2007) fue *T. maritimum*, sola o en combinación con diferentes especies del género *Vibrio*. En el caso de rodaballo se aisló también *A. salmonicida subsp. salmonicida* en algunas plantas de cultivos. Todas ellas fueron virulentas en rodaballo y lenguado.
2. *In vitro* *T. maritimum* inhibe la actividad estallido respiratorio de los granulocitos e induce su apoptosis.
3. Las técnicas para el estudio de parámetros hematológicos (hematocrito y poblaciones celulares) e inmunológicos (actividad lisozima y estallido respiratorio de los granulocitos), optimizadas en el presente estudio, son de utilidad para evaluar el estado de salud de los peces y su respuesta inmunitaria frente a la infección y la vacunación.
4. La infección experimental de rodaballos con *T. maritimum* produce cambios en el hematocrito y en la población de leucocitos e incrementos en las actividades lisozima y estallido respiratorio.
5. Los parámetros de producción y la composición antigénica (vacunas mono o bivalentes) de la vacuna no afectan a la eficacia de la inmunización frente a la tenacibaculosis. Por tanto, el uso de vacunas anti-*T. maritimum*, formuladas con antígenos de una cepa virulenta representativa de uno de los serotipos patógenos de esta especie bacteriana, puede ser de utilidad en la prevención de la tenacibaculosis.
6. La vía de administración de la vacuna y la temperatura de mantenimiento de los peces tras la inmunización afectan al desarrollo de la respuesta inmune protectora.



10.-BIBLIOGRAFÍA

- Ackerman, P.A., George, K., Iwama, Thornton, J.C. Physiological and Immunological Effects of Adjuvanted *Aeromonas salmonicida* Vaccines on Juvenile Rainbow Trout. *Journal of Aquatic Animal Health*. 2000. 12 (2): 157-164.
- Abram , Q.H., Dixon, B., Katzenback, B. Impacts of low temperature on the teleost immune system. *Biology (Basel)*. 2017.
- Adams, A. *Fish Vaccines*. Birkhauser Advances in Infectious Diseases. Springer Basel. 2016.
- Afonso,
- Agius, C. Infection by an Ichthyophonus-like fungus in the deep-sea scabbard fish *Aphanopus carbo* (Trichiuridae) in the North East Atlantic. *Journal of Fish Diseases*. 1978. 1:191-193.
- Agius, C., Horne, M. T., Ward, P. Immunisation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) against vibriosis: Comparison of an extract antigen with whole cell bacteria by oral and intra-peritoneal routes. *Journal of Fish Diseases*. 1983. 6:129-134.
- Alsina, M., Blanch, A.R. First isolation of *Flexibacter maritimus* from cultivated turbot (*Scophthalmus maximus*). *Bulletin of European Association of Fish Pathology*. 1993. 13:157-160.
- Alsina, M., Martinez-Picado, J., Jofre, J., Blanch, A. R. A medium for presumptive identification of *Vibrio anguillarum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1994. 60:1681-1683.
- Amend, D. F. Potency testing of fish vaccines. *Developmental Biology. Standard*. 1981. 49: 447-454.
- Amend, D.F., Johnson, K.A. Current status and future needs of *Vibrio anguillarum* bacterin. *Developmental in Biology. Standardizacion*. 1981. 49: 403-417.
- Anacker, R.L., Ordal, E.J. Studies on the myxobacterium *Chondrococcus columnaris*. I Serological typing. *Journal of Bacteriology*. 1959. 78:25-32.
- Anacker. R. L., Ordal, E. J. Study of a bacteriophage infecting the myxobacterium *Chondrococcus columnads*. *Journal of Bacteriology*. 1955. 70(6):738-741.
- Aoki, T., Kitao, T., Kawano, K. Changes in drug resistance of *Vibrio anguillarum* in cultured ayu, *Plecoglossus altivelis* Temminck and Schlegel, in Japan. *Journal of Fish Diseases*. 1981. 4:223-230.

- Aoki, T., Sakai, M., Takahashi, S. Protective immunity in Ayu, *Plecoglossus altivelis*, vaccinated by immersion with *Vibrio anguillarum*. Fish Pathology. 1984. 19:181-185.
- Apromar, Informe: La acuicultura en España, 2016. Disponible en: www.apromar.es/content/informes.
- Apromar, Informe: La acuicultura en España, 2018. Disponible en: www.apromar.es/content/informes.
- Arijo, S., Rico, R., Chabrillon, M., Díaz-Rosales, P., Martínez-Manzanares, E., Balebona, M.C., Magariños, B., Toranzo, A.E., Moriñigo, M.A. Effectiveness of a divalent vaccine for sole, *Solea senegalensis* (Kaup), against *Vibrio harveyi* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Journal of Fish Diseases. 2005. 28:33-38.
- Austin, B., Austin D. A. Bacterial Fish Pathogens; Disease of Farmed and Wild Fish. Springer. 2016. 63-79. Sixth edition.
- Austin, D. A., McIntosh, D., Austin, B. Taxonomy of fish associated *Aeromonas spp.*, with the description of *Aeromonas salmonicida* subsp. *smithia* subsp. *nov.* Systematic and Applied Microbiology. 1989. 11:277-290.
- Avendaño-Herrera, R., Irgang, R., Sandoval, C., Moreno-Lira, P., Houel, A., Duchaud, E., Poblete-Morales, M., Nicolas, P., Ilardi, P. Isolation, Characterization and Virulence Potential of *Tenacibaculum dicentrarchi* in Salmonid Cultures in Chile. Transbound and Emerging Diseases. 2016. 63(2):121.
- Avendaño-Herrera, R., Toranzo, A.E., Romalde, J.L., Lemos, M.L., Magariños, B. Iron Uptake Mechanisms in the Fish Pathogen *Tenacibaculum maritimum*. Applied and Environmental Microbiology. 2005. 71:116947-116953.
- Avendaño-Herrera, R., Núñez, S., Magariños, B., Toranzo, A. E. A non-destructive method for rapid detection of *Tenacibaculum maritimum* in farmed fish using nested PCR amplification. Bulletin of European Association of Fish Pathology. 2004. 24:280-286.
- Avendaño-Herrera, R., Toranzo, A.E., Magariños, B. Tenacibaculosis infection in marine fish caused by *Tenacibaculum maritimum*: a review. Diseases of Aquatic Organisms. 2006. 71:255-66.
- Bader, J. A., Shotts, Jr. E.B. Identification of *Flavobacterium* and *Flexibacter* species by species-specific polymerase chain reaction primers to the 16S Ribosomal RNA gene. Journal of Aquatic Animal Health. 1998. 10:311-319.
- Balcázar, J. L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D., Múzquiz, J. L. Quantitative detection of *Aeromonas salmonicida* in fish tissue by real-time PCR using self-quenched, fluorogenic primers. Journal of Medical Microbiology. 2007. 56:323-328.
- Barnes, A.C., Bowden, T.J., Horne, M.T., Ellis, A.E. Peroxide-inducible catalase in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* protects against exogenous hydrogen peroxide and killing by activated rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* L., macrophages. Microbial Pathogenesis. 1999. 26:149-158.

- Barry, L. A., Thornsberry, C. Susceptibility test: diffusion test procedures. En: Ballows, A., Hausler, W. L., Isenberg, D. H., Shadomy, J. H., eds. Manual of Clinical Microbiology: ASM, Washington. 1991. 1117-1125.
- Bassity, E., Clark, T.G. Functional Identification of Dendritic Cells in the Teleost Model, Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). 2012. PLOS ONE 7(3): e33196.
- Baudin Laurencin, F., Tangtrongpiros, J. Some results of vaccination against vibriosis in Brittany. En: Ahne, W. (ed.) Fish disease, COPRAQ Session. Springer, Heidelberg. 1980. 60-68. Tercera edición.
- Baxa, D.V., Kawai, K., Kusuda, R. Experimental infection of *Flexibacter maritimus* in black sea bream (*Acanthopagrus schlegeli*) fry. Fish Pathology. 1987. 22:105-109.
- Baxa, D.V., Kawai, K., Kusuda, R. In vitro and in vivo activities of *Flexibacter maritimus* toxins. Reports of the USA Marine Biological Institute, Kochi University. 1988. 10:1-8.
- Beaz-Hidalgo, R., Cleenwerck, I., Balboa, S., De Wachter, M., Thompson, F., Swings, J., De Vos, P., Romalde, J. L. Diversity of *Vibrios* associated with reared clams in Galicia (NW Spain). Systematic and Applied Microbiology. 2008. 31:215-222.
- Belland, R. J., Trust, T. J. DNA-DNA reassociation analysis of *Aeromonas salmonicida*. Journal of General Microbiology. 1988. 134:307-315.
- Bergh, Ø., Nilsen, F., Samuelsen, O. B. Diseases, prophylaxis and treatment of the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*; a review. Diseases of Aquatic Organisms. 2001. 48:57-74.
- Bernadet, J. F., Nakagawa, Y., Holmes, B. Proposed minimal standards for describing new taxa of the Family *Flavobacteriaceae* and emended description of the Family. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2002. 52:1049-1070.
- Bernadet, J.F., Campbell, A.C., Buswell, J.A. *Flexibacter maritimus* is the agent of “black patch necrosis” in Dover sole. Scotland Diseases of Aquatic Organisms. 1990. 8:233-237.
- Bernadet, J.F., Kerouault, B., Michel, C. Comparative study on *Flexibacter maritimus* strains isolated from farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in France. Fish Pathology. 1994. 29:105-111.
- Bernadet, J.F. Immunization with bacterial antigens: *Flavobacterium* and *Flexibacter* infections. En: Fish Vaccinology. R. Gudding, A. Lillehaug, P.J. Midtlyng and F. Brown, Eds. Karger. Basel, Switzerland. 1997. 179- 188.
- Biller-Takahashi, J.D., Takahashi, L.S., Pilarski, F.F., Sebastião, A., Urbinati, E.C. Serum bactericidal activity as indicator of innate immunity in pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2013. 65(6):1745-1751.
- Blaxhall, P.C. The haematological assessment of the health of freshwater fish. Journal of fish Biology. 1972. 4(4):593-604.

- Boesen, H.T., Larsen, M.H., Larsen, J.L., Ellis, A.E. In vitro interactions between rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) macrophages and *Vibrio anguillarum* serogroup O2a. *Fish Shellfish Immunology*. 2001. 11:415–431.
- Bogwald, J., Stensvag, K., Hoffman, J., Jorgensen, T. Antibody specificities in Atlantic salmon *Salmo salar* L., against the fish pathogens *Vibrio salmonicida* and *Vibrio anguillarum*. *Journal of Fish Diseases*. 1991. 14:79-87.
- Bortner, C.D., Oldenburg, N.B., Cidlowski, J.A. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends in Cell Biology*. 1995. 5(1):21-6.
- Bowden, T.J., Butler, R., Bricknell, I.R., Ellis, A.E. Serum trypsininhibitory activity in five species of farmed fish. *Fish and Shellfish Immunology*. 1997. 7:377–385.
- Bowden, T., Bricknell, I., Ellis, A.E. Fish Vaccination, an overview. Industry report IntraFish. 2003. 5-20.
- Braaten, A.B., Hodgins, H.O. Protection of steelhead trout (*Salmo gairdneri*) against vibriosis with a living low virulence strain of *Vibrio anguillarum*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 1976. 33:845-847.
- Brenden, R.A., Huizinga, H.W. Pathophysiology of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in mice. *Journal of Medical Microbiology*. 1986. 21(4):311-317.
- Bruno, D.W., Poppe, T.T. Diseases of uncertain aetiology. Cardiac myopathy syndrome. In: Bruno, D. W., Poppe, T.T. (eds). *A color atlas of salmonid diseases*. Academic Press, London. 1996. 140–141.
- Buck JD. Nonstaining (KOH) method for determination of gram reactions of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 1982. 44(4):992-3.
- Budiño, B., Cal, R.M., Piazzon, M.C., Lamas, J. The activity of several components of the innate immune system in diploid and triploid turbot. *Comparative Biochemmistry and Physiology A Molecular and Integrative Physiology*. 2006. 145(1):108-13.
- Buller, B.N. *Bacteria and Fungi from Fish and Other Aquatic Animals. A Practical Identification Manual*. Department of Agriculture and Food, Western Australia. 2014. 2^a edición.
- Bullock, G.L., Hsu T.C., Shotts Jr. E.B. Columnaris disease of fishes. *Fish Disease Leaflet* 72. US Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, Division of Fisheries and Wetland Research, Washington D.C. 1986. 9.
- Busch, R.A. Polyvalent vaccines in fish: the interactive effects of multiple antigens. *Developments in Biological Standardization Aquatic Animal Health Division, Alpharma, Inc., Bellevue, WA, USA*. 1997. 90: 245-256.
- Campbell, A.C., Buswell, J.A. An investigation into the bacterial aetiology of 'black patch necrosis' in Dover sole, *Solea solea* L. *Journal of Fish Diseases*. 1982. 5:495-508.

- Campos-Perez, J.J., Ellis, A.E., Secombes, C.J. Investigation of factors influencing the ability of *Renibacterium salmoninarum* to stimulate rainbow trout macrophage respiratory burst activity. *Fish and Shellfish Immunology*. 1997. 7:555-566.
- Canestrini G. La malatti dominate delle anguille. *Atti Institute Veneto Service*. 1893. 7:809–814.
- Cárdenas, W., Dankert, J.R., Jenkins, J.A. Flow cytometric analysis of crayfish haemocytes activated by lipopolysaccharides. *Fish and Shellfish Immunology*. 2004. 17(3):223-33
- Cascales Angosto, M. Estallido respiratorio de los fagocitos. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 2005. 71: 365-386
- Carson, J., McCosh, P., Schmidtke, L. Pathogenicity of *Flexibacter maritimus* in rainbow trout. In: Barriers and breakthroughs. Proceedings of the SALTAS Research Review Seminar. Ed: Valentine P, SALTAS P/L, Hobart, Tasmania. 1992. 89-99.
- Carson, J., Schmidtke, L., Lewis, T. Development of a vaccine against disease. Results of efficacy testing of three types of vaccine. In: Barriers and Breakthroughs. Papers from the Saltas. Research and Development Review Seminar, Hobart, Tasmania. 1993. 149-158.
- Castro, N., Magariños, B., Nuñez, S., Toranzo, A.E. Reassessment of the *Tenacibaculum maritimum* serotypes causing mortalities in cultured marine fish. *Bulletin- European Association of Fish Pathologists*. 2007. 27(6):229.
- Castro, R., Couso, N., Obach, A., Lamas, J. Effect of different β - glucans on the respiratory burst of turbot (*Psetta maxima*) and gilthead seabream (*Spaurus aurata*) phagocytes. *Fish and Shellfish Immunology*. 1999. 9(7):529-541.
- Cepeda C., Santos Y. First isolation of *Flexibacter maritimus* from farmed Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) in Spain. *Bulletin- European Association of Fish Pathologists*. 2002. 22:388–391.
- Cepeda, C. Desarrollo de sistemas eficaces para el cultivo y la identificación de *Flavobacterium psychrophilum* y *Tenacibaculum maritimum*. 2003. Tesis Doctoral Universidad de Santiago de Compostela.
- Chalmers, L., Thompson, K.D., Taylor, J.F., Black, S., Migaud, H., North, B. A comparison of the response of diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar*) siblings to a commercial furunculosis vaccine and subsequent experimental infection with *Aeromonas salmonicida*. *Fish and Shellfish Immunology*. 2016. 57:301–308.
- Chart, H., Trust, T. J. Characterization of the surface antigens of the marine fish pathogens. *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Canadian Journal of Microbiology*. 1984. 30:703-710.
- Chaves Pozo, E., Muñoz, P., López Muñoz, A., Pelegrín, P., García Ayala, A., Mulero, V., Meseguer, J., Early innate immune response and redistribution of inflammatory cells in the bony fish gilthead seabream experimentally infected with *Vibrio anguillarum*. *Cell Tissue Research*. 2005. 320:61-68.

- Chaves-Pozo, E., Valero, Y., Esteve-Codina, A., Gómez-Garrido, J., Dabad, M., Alioto, T., Meseguer, J., Esteban, M.Á., Cuesta, A. Innate Cell-Mediated Cytotoxic Activity of European Sea Bass Leucocytes Against Nodavirus-Infected Cells: A Functional and RNA-seq Study. *Scientific Reports*. 2017. 13(7-1):15396.
- Chen, C.Y., Wooster, G.A., Bowser, P.R. Comparative blood chemistry and histopathology of tilapia infected with *Vibrio vulnificus* or *Streptococcus iniae* or exposed to carbon tetrachloride, gentamicin, or copper sulphate. *Aquaculture*. 2004. 239(1-4):421-443.
- Chen, M.F., Henry-Ford, D., Groff, J.M. Isolation and characterization of *Flexibacter maritimus* from marine fishes of California. *Journal Aquatic Animal Health*. 1995. 7:318-326.
- Chen, S.C., Yoshida, T., Adams, A., Thompson, K.D., Richards, R.H. Non-specific immune response of Nile tilapia, *Oreochromis nilotica*, to the extracellular products of *Mycobacterium spp.* and to various adjuvants. *Journal of fish diseases*. 1998. 21, 39-46.
- Chettri, J.K., Raida, M.K., Holten-Andersen, L., Buchmann, K. PAMP induced expression of immune relevant genes in head kidney leukocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Developmental and comparative immunology*. 2010. 35(4):476-82.
- Chilmonzyk, S., Monge, D. Flow cytometry as a tool for assessment of the fish cellular immune response to pathogens. *Fish and Shellfish Immunology*. 1999. 9:319-333.
- Chin, A., Woo, P.T.K. Innate cell-mediated immune response and peripheral leukocyte populations in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., to a live *Cryptobia salmositica* vaccine. *Parasitology Research*. 2005. 95:299-304.
- Cipriano, R. C. Immunogenic potential of growth products extracted from cultures of *Aeromonas salmonicida* for brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 1982. 39:1512-1518.
- Cipriano, R. C., Pyle, S. W. Adjuvant dependent immunity and the agglutinin response of fishes against *Aeromonas salmonicida*, cause of furunculosis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 1985. 42:1290-1295.
- Chen, S.C., Yoshida, T., Adams, K.D. Thompson, Richards. Nonspecific immune response of Nile tilapia. *Oreochromis nilotica*, to the extracellular products of *Mycobacterium spp.* and to various adjuvants. *Journal of fish Diseases*. 1998. 21:39-46.
- Clem, L.W., Sizemore, R.C., Ellsaesser, C.F., Miller, N.W. Monocytes as accessory cells in fish immune responses. *Developmental and Comparative Immunology*. 1985. 9(4):803-9.
- Company, R., Sitjà-Bobadilla, A., Pujalte, M. J., Garay, E., Álvarez-Pellitero P., Pérez-Sánchez, J. Bacterial and parasitic pathogens in cultured common dentex, *Dentex dentex* L. *Journal of Fish Diseases*. 1999. 22:299-309.
- Cook, M.T., Morrison, R.N., Wilkinson, R., Hayball, J.D. A screen of mammalian antibodies on snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae) peripheral blood leukocytes reveals cross

- reactivity of an anti-human CD3 antibody with a population of mIg- cells. *Developmental and Comparative Immunology*. 2001. 25(7):553-9.
- Cordero, H., Morcillo, P., Cuesta, A., Brinchmann, M.F., Esteban, M.A. Differential proteome profile of skin mucus of gilthead seabream (*Sparus aurata*) after probiotic intake and/or overcrowding stress. *Journal Proteomics*. 2016. 132: 41–50.
- Cornick, J. W., Morrison, C. M., Zwicker, B., Shum, G. Atypical *Aeromonas salmonicida* infection in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Journal Fish Diseases*. 1984. 7:495-499.
- Costelli Bautista, G.A. Estudio de la patogenia y de los mecanismos inmunológicos en la infección por *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* en rodaballos (*Scophthalmus maximus*). 2014. Tesis Doctoral Universidad Santiago de Compostela
- Couso, N., Castro, R., Noya, M., Lamas, J. Location of superoxide production sites in turbot neutrophils and gilthead seabream acidophilic granulocytes during phagocytosis of glucan particles. *Developmental and Comparative Immunology*. 2001. 25(7):607-618.
- Crippen, T L. C., Bootland, L.M., Leong J. C., Fitzpatrick, M. S., B. Schreck C., Vella, A.T. Analysis of Salmonid Leukocytes Purified by Hypotonic Lysis of Erythrocytes. *Journal of Aquatic Animal Health*. 2001. 13:234–245.
- Cuesta, A., Esteban, M., Meseguer, J. Natural cytotoxic activity in seabream (*Sparus aurata* L.) and its modulation by Vitamin C. *Fish and Shellfish Immunology*. 2002. 13:97-109.
- Dalmo, R., Ingebrigtsen, K., Bogwald, J. Non-specific defenses mechanisms in fish, with particular reference to reticuloendothelial system (RES). *Journal Fish Diseases*. 1997. 20:241-273.
- Dalsgaard, I., Paulsen, H. Atypical *Aeromonas salmonicida* isolated from diseased sand-eels, *Ammodytes lancea* (Cuvier) and *Hyperoplus lanceolatus* (Lesauvege). Enger, Gunnlaugsdott. *Journal Fish Diseases*. 1986. 9:361-364.
- DeKoning, J., Kaattari, S. Mitogenesis of rainbow trout peripheral blood lymphocytes requires homologous plasma for optimal responsiveness. *In Vitro Cell Developmental Biology*. 1991. 27:381-386.
- Devesa, S., Barja, J. L., Toranzo, A. E. Ulcerative skin and fin lesions in reared turbot, *Scophthalmus maximus* (L). *Journal Fish Diseases*. 1989. 12, 323-333.
- Devesa, S., Toranzo, A.E., Barja, J.L. First report of vibriosis in turbot (*Scophthalmus maximus*) cultured in Northwestern Spain. En: Ellis, A. E. (ed.) *Fish and shellfish pathology*. Academic Press, London. 1985. 131-140.
- Dixon, B., Stet, R.J.M. The relationship between major histocompatibility receptors and innate immunity in teleost fish. Invited Review. *Developmental and Comparative Immunology*. 2001. 25(8-9):683-699.
- Duff, D.C.B. The oral immunization of trout against *Bacterium salmonicida*. *Journal Immunology*. 1942. 44:87-94.

- El Morabit, A., Garcia Marquez, S., Santos, Y. Is sea lamprey a potential source of infection with *Aeromonas salmonicida* for wild and farmed fish. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists. 2004. 24:100–104.
- El Morabit, A., Seoane, R., Carballas, C.G., Santos, Y. Flow cytometric study of phagocytic and oxidative burst activities of turbot head-kidney leucocytes in response to *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* and *Tenacibaculum maritimum*. Recent Research Developments in Microbiology. Research Signpost. 2006.
- El-Etr S.H., Yan L., Cirillo J.D. Fish monocytes as a model for mycobacterial host-pathogen interactions. Infection and Immunity. 2001. 69(12):7310–7317.
- Elliot, D.G., Shotts, E.B. Jr. Aetiology of an ulcerative disease in goldfish, *Carassius auratus* (L): microbiological examination of diseased fish from seven locations. Journal Fish Diseases. 1980. 3:133-143.
- Ellis A.E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. Developmental and Comparative Immunology. 2001. 25(8-9):827-39.
- Ellis, A. An appraisal of the extracellular toxins of *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*. Journal of Fish Diseases. 1991. 14:265-277.
- Ellis, A. E. Vaccines for farmed fish. En: Veterinary Vaccinology. Ed. P.P.Pastoret, J. Blancou. P. Vannier & C. Verschueren, Elsevier: Amsterdam. 1997. 441-17.
- Ellis, A.E. Immunology of fishes. Ontogeny of the immune system. En: Handbook of Vertebrate Immunology. P.P.Pastoret, P. Griebel, H. Bazin, A. Govaerts. Academic Press, London. 1998. 26-30.
- Ellis, A.E. Immunity to bacteria in fish. Fish and Shellfish Immunol. 1999. 9:291-308.
- Ellis, A.E. Fish Vaccination. Academic Press, San Diego. 1988a.
- Ellis, A.E. Current aspects of fish vaccination. Diseases of Aquatic Organisms. 1988b. 4:159-164.
- Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. Toxicol Pathol 35. 2007. 4: 495-516.
- EMA/CVMP/IWP/314550/2010. Guideline on the design of studies to evaluate the safety and efficacy of fish vaccines. (http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/11/WC500118226.pdf). Fecha acceso; 27/06/2018.
- Esteban, M. A., Mulero, V., Muñoz, J., Meseguer, J. Methodological aspects of assessing phagocytosis of *Vibrio anguillarum* by leucocytes of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) by flow cytometry and electron microscopy. Cellular Tissue Research. 1998. 293:133-141.

- Estévez, J., Leiro, J., Santamarina, M.T., Dominguez, J., Ubeira, F.M. Monoclonal antibodies to turbot (*Scophthalmus maximus* L.) immunoglobulins: characterization and applicability in immunoassays. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1994. 41: 353-366.
- European Pharmacopoeia. Vibriosis vaccine (inactivated) for salmonids. 2013. Ph.Eur.04/2013:1581.
- European Pharmacopoeia. Furunculosis vaccine (inactivated, oil adjuvanted, injectable) for salmonids. 2015. Ph.Eur.01/2015:1521.
- Evelyn, T.P.T. First record of vibriosis in Pacific salmon cultured in Canada and taxonomic status of the responsible bacterium, *Vibrio anguillarum*. *Journal of the Fishery Research Board of Canada*. 1971. 28:517-525.
- Evelyn, T.P.T. An improved growth medium for the ludney disease bacterium and some notes on using the medium. *Bull Off Int Epizoot*. 1977. 87(5-6):511-513.
- Evelyn, T.P.T. Immunization against pathogenic vibrios. In: de Kinkelin, P., Michel, C. (eds.) *Symposium on fish vaccination*. O. I. E. Fish Diseases Commission, Paris. 1984. 121-150.
- Evelyn, T.P.T., Ketcheson, J.E. Laboratory and field observations on antivibriosis vaccines. En: Ahne, W. H. (ed.) *Fish disease, COPRAQ Session*. Springer, Heidelberg. 1980. 45-52. Tercera edición.
- Failde, L.D., Losada, A.P., Bermúdez, R., Santos, Y., Quiroga, M.I. *Tenacibaculum maritimum* infection: Pathology and immunohistochemistry in experimentally challenged turbot (*Psetta maxima* L.). *Microbial Pathogenesis*. 2013. 82-88.
- Failde, D., Vilar, P., Losada, A.P., Bermúdez, R., Santos, Y., Riaza, A., Nieto, J.M., Quiroga, M.I. Tenacibaculosis en lenguado senegalés, *Solea senegalensis* L.: estudio morfológico e inmunohistoquímico. En: *X Foro de Acuicultura e Recursos Mariños das Rías Galegas*. 2008. 403-410.
- Failde, L.D., Losada, A.P., Bermudez, R., Santos, Y., Quiroga, M.I. Evaluation of immune response in turbot (*Psetta maxima* L.) tenacibaculosis: Haematological and immunohistochemical studies. *Microbial Pathogenesis*. 2014. 76:1-9.
- Failde, L.D. Tenacibaculosis en lenguado y rodaballo. Caracterización morfológica y de la respuesta inmunitaria. 2012. Tesis Doctoral Universidad de Santiago de Compostela.
- Faisal, M., Eissa, A.E., Elsayed, E.E. Isolation of *Aeromonas salmonicida* from sea lamprey (*Petromyzon marinus*) with furuncle-like lesions in lake Ontario. *Journal of Wildlife Diseases*. 2007. 43(4):618-622.
- FAO. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2014. Roma. 2014.
- Fernández, A.B., de Blas, I., Ruiz, I. El sistema inmune de los teleósteos (I): Células y órganos. *Revista Aquatic*. 2002. 16.
- FAO. State of world aquaculture: FAO Fisheries Technical paper. 2006.

- FAO Fish State Journal. Programa de estadísticas pesqueras. 2018.
- FAO The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA) 2016. Departamento de Pesca. Roma. 2016.
- Fernández-Álvarez, C. Torres-Corral, Y., Y. Santos. Comparison of serological and molecular typing methods for epidemiological investigation of *Tenacibaculum* species pathogenic for fish. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018. 102:1779-1789.
- Fernández-Álvarez, C., F. Gonzales, S., Y. Santos. Development of a SYBR green I real-time PCR assay for specific identification of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016. 100(24):10585–10595
- Figueras, A., Santarém, M., Novoa, B. In vitro immunosuppression of turbot (*Scophthalmus maximus*) leucocytes by high doses of a glucans with/without vaccine. *Fish Pathology*. 1997. 32(3):153-157.
- Fischer, U., Utke, K., Somamoto, T., Kollner, B., Ototake, M., Nakanishi, T. Cytotoxic activities of fish leucocytes. *Fish Shellfish Immunology*. 2006. 20:209-226.
- Fletcher, T.C., White, A. Antibody production in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) after oral and parenteral immunization with *Vibrio anguillarum*. *Aquaculture*. 1973. 1:417-428.
- Fryer, J. L., Nelson, J. S., Garrison, R. L. Vibriosis in fish. *Fisheries Science Program*. 1972. 5:129-133.
- Fryer, J.L., Rohovec, J.S., Garrison, R.L. Immunization of salmonids for control of vibriosis. *Marine Fisheries Review*. 1978. 40:20-23.
- García, F., Schalch, S.H.C., Onaka, E.M. Hematologia de tilapia do nilo alimentada com suplemento a base de algas frente a desafios de estress agudo y crónico. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2012. 64:198-204.
- Georgiadis, M.P., Gardner I.A., Hedrick R.P. The role of epidemiology in the prevention, diagnosis, and control of infectious diseases of fish. *Preventive Veterinary Medicine*. 2001. 48:287-302.
- Godoy, M.G., Kibenge, M.J. Taqman real-time RT-PCR detection of infectious salmon anaemia virus (ISAV) from formalin fixed paraffin embedded Atlantic salmon *Salmo salar* tissues. *Diseases Aquatic Organisms*. 2010. 90(1):25-30.
- Gomez, D., Sunyer, J.O., Salinas, I. The mucosal immune system of fish: the evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. *Fish Shellfish Immunol*. 2013. 35(6):1729-39.
- Gonzalez, S.F., Krug, M.J., Nielsen, M.E., Santos, Y., Call, D.R. Simultaneous Detection of Marine Fish Pathogens by Using Multiplex PCR and a DNA Microarray. *Journal Clinical Microbiology*. 2004. 42:1414-1419.

- Gonzalez, S.F., Osorio, C.R., Santos Y. Development of a Pcr-based method for the detection of *Listonella Anguillarum* in fish tissues and blood samples. Diseases of Aquatic Organisms. 2003. 55:109-115.
- Gould, R.W., O'Leary, P.J., Garrison, R.L., Rohovec, J.S., Fryer, J.L. Spray vaccination: a method for the immunization of fish. Fish Pathology. 1978. 13:63-68.
- Gravningen, K., Thorarinsson, R., Johansen, L.H., Nissen, B., Rikardsen, K. S., Greger, E., Vigneulle, M. Bivalent vaccines for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against vibriosis and pasteurellosis. Journal Applied Ichthyology. 1998. 14(3-4):159-162
- Greger, E., Goodrich, T. Vaccine development for winter ulcer disease, *Vibrio viscosus* in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Journal of Fish Diseases. 1999. 22:193-199.
- Green, D.R., Reed, J.C. Mitochondria and apoptosis. Science. 1998. 281:1309-1312.
- Green, D.R., Kroemer, G. The central executioner of apoptosis mitochondria or caspase? Trends in Cell Biology. 1998. 8:267-271.
- Griffin, P.J., Snieszko, S.F., Friddle, S.B. Pigment formation by *Bacterium salmonicida*. Journal Bacteriology. 1953. 65:652-659.
- Grinde, B., Jollès, J., Jollès, P. Purification and characterization of two lysozymes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). European Journal Biochemistry. 1988. 173(2):269-73.
- Grinde, B. Lysozyme from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, as an antibacterial agent against fish pathogens. Journal of fish diseases. 1989. 12(2):95-104.
- Groberg, W. J. Infection and the immune response induced by *Vibrio anguillarum* in juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). 1982. Ph.D. thesis, Oregon State University, CorvalHs.
- Guardiola A., Cuesta, A., Abellán, E., Meseguer, J., Esteban, MA. Comparative analysis of the humoral immunity of skin mucus from several marine teleost fish. Fish and Shellfish Immunology. 2014. 40 (1):24-3.
- Gudding, R., Lillehaug A., Evensen, Ø. Recent developments in fish vaccinology. Veterinary Immunology Immunopathology. 1999. 72:203-212.
- Gudding, R., Lillehaug A., Evensen, Ø. Fish vaccination. Wile Y Blackwell. John Wiley and Sons Ltd. UK. 2014.
- Gustafson C., Thomas C.J., Trust T.J. Detection of *Aeromonas salmonicida* from fish by using polymerase chain reaction amplification of the virulence surface array protein gene. Applied and Environmental Microbiology. 1992 58:3816–3825.
- Häcker, G., Fischer, S.F. Bacterial anti apoptotic activities. FEMS Microbiology letter. 2002. 211:1-6.

- Handler, J., Soltani, M., Percival, S. The pathology of *Flexibacter maritimus* in aquaculture species in Tasmania, Australia. *Journal of Fish Diseases*. 1997. 20:159–168.
- Hansen, G.H., Bergh, Ø., Michaelsen, J., Knappskog, D. *Flexibacter ovolyticus* sp. nov., a pathogen of eggs and larvae of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* *International journal of systematic bacteriology*. 1992. 42:451–458.
- Hanstrings, TS., Ellis, A.E. *The humoral immune response of rainbow trout, Salmo gairdneri* Richardson, and rabbits to *Aeromonas salmonicida* extracellular products. *Journal of Fish Diseases*. 1988. 11(2):147.160.
- Harbell, S.C., Hodgins, H.O., Schiewe, M.H. Studies on the pathogenesis of vibriosis in coho salmon *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*. 1979. 2:39144.
- Harikrishnan, R., Rani, M.N., Balasundaram, C. Hematological and biochemical parameters in common Carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquaculture*. 2003. 221(1-4):41-50.
- Harrel, L.W., Etlinger, H.M., Hodgins, H.O. Humoral factors important in resistance of salmonid fish to bacterial disease. II. Anti-*Vibrio anguillarum* activity in mucus and observations on complement. *Aquaculture*. 1976. 7:363-370.
- Hastein, T., Saltveit, S.J., Roberts, R.J. Mass mortality among minnows *Phoxinus phoxinus* (L.) in Lake Tveitevatn, Norway, due to an aberrant strain of *Aeromonas salmonicida*. *Journal of fish diseases*. 1978. 1(3):241-249.
- Haugland, G.T., Jakobsen, R.A., Vestvik, N., Ulven, K., Stokka, L. Phagocytosis and Respiratory Burst Activity in Lumpsucker (*Cyclopterus lumpus* L.) Leucocytes Analysed by Flow Cytometry. 2012. PLOS ONE 7(10): e47909.
- Hayashi, K., Kobayashi, S., Jamata, T., Ozaki, H. Studies on the vibrio disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri irideus*). II. Prophylactic vaccination against the vibriodisease. *Journal Faculty of Fisheries, Prefectural University of Mie, Tsu*. 1964. 6:181-191.
- Heppell, J., Davis, H.L. Application of DNA vaccine technology to aquaculture. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2000. 43:29-43.
- Hibiya, T. An Atlas of Fish Histology. Normal and Pathological Features. Gustav Fischer den Verlag. Stuttgart. 1994. 5-125.
- Hickey, M., Lee, J.L. A comprehensive review of *Vibrio (Listonella) anguillarum*: ecology, pathology and prevention. *Reviews in Aquaculture*. 2017.
- Hikida, M., Wayabayashi, H., Egusa, H. and Masumura, K. *Flexibacter* spp. A gliding bacterium pathogenic to some marine fishes in Japan. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 1979. 45:421-428.
- Hiney, M. How to test: Methods of field validation for non-culturable-based detection techniques. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 1997. 17:254-250.

- Hiney, M.P., Smith, P.R. Validation of polymerase chain reaction-based techniques for proxy detection of bacterial fish pathogens: Framework, problems and possible solutions for environmental applications. *Aquaculture*. 1998. 162:41-68.
- Hiney, M., Dawson, M.T., Heery, D.M., Smith, P.R., Gannon, F., Powell, R., DNA Probe for *Aeromonas salmonicida*. *Applied Environment. Microbiology*. 1992. 58:1939-1042.
- Hirono, I., Masuda, T., Aoki, T. Cloning and detection of the hemolysin gene of *Vibrio anguillarum*. *Microbial Pathogenesis*. 1996. 21:173-182.
- Hirst, I.D., Ellis, A.E. Iron regulated outer membrane proteins of *Aeromonas salmonicida* are important protective antigens in Atlantic salmon against furunculosis. *Fish and Shellfish Immunology*. 1994. 4:29-45.
- Hofer, B. Handbuch der fisch krankheit. Munchen, Verlag des Allg. Fischerei-Ztg. Munich, Federal Republic of Germany. 1904. 359.
- Horne, M.T. The pathogenicity of *Vibrio anguillarum* (Bergman). In "Microbial Diseases of Fish" (R.J. Roberts, ed.) Academic Press, London. 1982. 171-187.
- Huerta, S., Goulet, E., Huerta-Yépez, S., Livingston, E. Screening and Detection of Apoptosis. *Journal of Surgical Research*. 2007. 139:143-156.
- Hurst, N.P. Molecular basis of activation and regulation of the phagocyte respiratory burst. *The Annals of the Rheumatic Diseases*. 1987. 46(4):265-72.
- Inoue, T. Moritomo, Y. Tamura, S. Mamiya, H. Fujino, T. Nakanishi. A new method for fish leucocyte counting and partial differentiation by flow cytometry, *Fish Shellfish Immunol.* (2002). 13:379-390.
- Ishibe, K., Yamanishi, T., Wang, Y., Osatomi, K., Hara, K., Kanai, K., Yamaguchi, K., Tatsuya, O. Comparative analysis of the production of nitric oxide (NO) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) from macrophages exposed to high virulent and low virulent strains of *Edwardsiella tarda*. *Fish Shellfish Immunol.* 2009. 27:386-389.
- Ishibe, K., Osatomi, K., Hara, K., Kanai, K., Yamaguchi, K., Oda, T. Comparison of the responses of peritoneal macrophages from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) against high virulent and low virulent strains of *Edwardsiella tarda*. *Fish Shellfish Immunology*. (2008). 24:243-251.
- Itami, T., Kusuda, R. Studies on spray vaccination against vibriosis in cultured ayu. II. Duration of vaccination efficacy and effect of different vaccine preparation. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 1980. 46:699-703.
- Iwanowicz, L.R., Densmore, C.L., Ottinger, C.A. Calcein AM release-based cytotoxic cell assay for fish leucocytes. *Fish Shellfish Immunology*. 2004. 16(2):127-37.
- Janeway, C.A., Travers, Jr.P., Walport, M., Shlomchik M.J. Immunobiology. Garland Science Publishing. Nueva York. 2005. Sexta edición.

- Johnson, K. A., Amend, D. F. Efficacy of *Vibrio anguillarum* and *Yersinia ruckeri* bacterins applied by oral and anal intubation of salmonids. *Journal and Fish Diseases*. 1983. 6:473-476.
- Kalgraff, C.A., Wergeland, H.I., Pettersen, E.F. Flow cytometry assays of respiratory burst in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) leucocytes. *Fish Shellfish Immunology*. 2011. 31(3):381-8.
- Kaneko, T., Colwell, R.R. The annual cycle of *Vibrio parahaetnolyticus* in Chesapeake Bay. *Microbial Ecology*. 1978. 4:135-155.
- Kanemori, Y., Nakai, T., Muroga, K. The role of extracellular protease produced by *Vibrio anguillarum*. *Fish Pathology*. 1987. 22:153-158.
- Kawai, K., Kusuda, R. Efficacy of the lipopolysaccharide vaccine against vibriosis in cultured ayu. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*. 1983. 49:511-514.
- Kawai, K., Kusuda, R., Itami, T. Mechanisms of protection in ayu vaccinated for vibriosis. *Fish Pathology*. 1981. 15:257-262.
- Kilpi, M., Nikoskelainen, S., Grannas, S., Nuutila, J., Järvisalo, O., Kaase, A., Lilius, E.M. Resistance to bacterial infectious diseases in rainbow trout (*Orchorynchus mykiss*). *Veterinary Immunology and Immunopatology*. 2013. 153:267-278.
- Kitlen, J.W., Hejbøl, E.K., Zinck T., Varming, K., Byatt, J.C., McLean, E. Growth performance and respiratory burst activity in rainbow trout treated with growth hormone and vaccine. *Fish and Shellfish Immunology*. 1997. 7:297-304.
- Kito, H., Ose, Y., Hayashi, K., Yonezawa, S., Sato, T., Ishikawa, T., Nagase, H. "Some properties of metallothioneins from hepato-pancreas and kidney in carp (*Cyprinus carpio*). *Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health*. 1984. 30:119-125.
- Kodama, H., Tijiwa, K., Moritomo, T., Nakanishi, T. Granulocyte responses to experimental injection of live and formalin-killed bacteria in carp (*Cyprinus carpio*). *Veterinary Immunology and Immunopatology*. 2002. 90:101-105.
- Köllner, B., Wasserrab, B., Kotterba, G., Fischer, U. Evaluation of immune functions of rainbow trout (*Orchorynchus mykiss*) how can environmental influences be detected?. *Toxicology Letters*. 2002. 131(1-2):83-95.
- Kovacs, N. Identification of *Pseudomonas pyocyaneaby* the Oxidase Reaction. *Nature*. 1956. 178:703.
- Kroemer, G., Zamzami, N., Susin, SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunology Today*. 1997. 18:44-51.
- Kusuda, R., Fukuda, Y. Agglutinating antibody titers and serum protein changes of yellowtail after immunization with *Pasteurella piscicida* cells. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 1980. 46:801-807.

- Kusuda, R., Komatsu, Y. Comparative study of fish pathogenic *Streptococcus* isolated from saltwater and freshwater fishes. Bull. Japanese Society Scientific Fishery. 1978. 44:1073-1078.
- Larsen, J. L. *Vibrio anguillarum*: Prevalence in three carbohydrate loaded marine recipients and a control. Zentabl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C. 1982. 3:519-530.
- Larsen, J. L., Willeberg, P. The Impact of terrestrial and estuarial factors on the density of environmental bacteria (Vibrionaceae) and faecal cohforms in coastal water. Zentbl Bakt. Hyg , I. Abt. Orig. B. 1984. 179:308-323.
- Larsen, J.L., Jensen, N.C., Christensen, N.O. Water pollution and the ulcer sínndrome in the cod (*Gadus morhua*). International Journal of Food, Agriculture and Veterinary Sciences. 1978. 2:207-216.
- Larsen, J.L., Pedersen K., Dalsgaard. *Vibrio anguillarum* serovars associated with vibriosis in fish. Journal of fish Diseases. 1994. 17:259-267.
- Lee, S.J., Kim, S.M., Kim, S.K., Nam, Y.K., Kim, D.S., Kim, K.H. Modulation of zymosan and phorbol ester stimulated respiratory burst of rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) phagocytes by staurosporine, genistein and sodium orthovanadate. Aquaculture. 2004. 237(1-4):1-7.
- Leiro, J., Ortega, M., Sanmartin, M. L., Ubeira, F. M. Non-specific response of turbot (*Scophthalmus maximus*, L.) adherent cells to microsporidian spores. Veterinary Immunology and Immunopathology. 2000. 75:81-95.
- Lemos, M., Toranzo, A., Barja, J. L. Antibiotic activity of epiphytic bacteria isolated from intertidal sea-weeds. Microbial Ecology. 1985. 11:149-163.
- Livesley, M.A., Smith, S.N., Armstrong, R.A., Barker, G.A. Characterisation of *Aeromonas* strains and species by pulsed field gel electrophoresis and principal components analysis. Journal Fish Diseases. 1999. 22:369-375.
- López, J.R., M. Piñeiro-Vidal, N. García-Lamas, R. de la Herran, J.I., Navas, I. Hachero-Cruzado, Y. Santos First isolation of *Tenacibaculum soleae* from diseased cultured wedge sole, *Dicologlossa cuneata* (Moreau) and brill, *Scophthalmus rhombus* (L.). Journal Fish Diseases. 2010. 33:273-278.
- Mabrok M., Machado M., Serra CR., Afonso A., Valente LMP., Costas B. Tenacibaculosis induction in the Senegaleses ole (*Solea senegalensis*) and studies of *Tenacibaculum maritimum* survival against host mucus and plasma. Journal of Fish Diseases. 2016. 39:1445-1455.
- MacCarthy, D.H. Some Ecological Aspects of the Bacterial Fish Pathogen *Aeromonas salmonicida*. In: Skinner, F.A. and Mackay, Journal Editions Aquatic Microbiology, Academic Press, London. 1977. 299-324.

- MacDonell, M. T., Colwell, R. R. Phylogeny of the Vibrionaceae, and recommendation of two new genera, *Listonella* and *Shewanella*. Systematic and Applied Microbiology. 1985. 6:171–182.
- Magariños, B., Pazos, F., Santos, Y., Romalde, J.L., Toranzo, A.E. Response of *Pasteurella piscicida* and *Flexibacter maritimus* to skin mucus of marine fish. Diseases of Aquatic Organisms. 1995. 21:103-108.
- Magariños, B., Castro, N., Toranzo, A.E. Furunculosis in Senegalensis sole (*Solea senegalensis*) cultured in a recirculation system. Veterinary Record. 2011. 168
- Magnadotir, B. Innate immunity of fish (overview). Fish Shellfish Immunol. 2006. 20:137–151.
- MAPAMA. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente Informes de consumo de pescado en hogares españoles 2017 Subdirección General. Estructura de la Cadena Alimentaria. Dirección General. Industria Alimentaria. Madrid. 2018 <http://www.mapama.gob.es/>
- Marchetti, P., Castedo, M., Susin, S.A., Zamzami, N., Hirsch, T., Macho, A., Haeffner, A., Hirsch, F., Geuskens, M., Kroemer, G. Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. Journal of Experimental Medicine. 1996. 184:1155–1160.
- Marsden, M.J., Secombes, C.J. Antigen-induced release of macrophage activating factor from rainbow trout *Orchorynchus mykiss* leucocytes. Veterinary Immunology and Immunopathology. 1994. 42:199-208.
- Martínez-Picado, J., Alsina, M., Blanch, A. R., Cerda, M., Joffre, J. Species specific detection of *Vibrio anguillarum* in marine aquaculture environments by selective culture and DNA hybridization. Applied and Environmental Microbiology. 1996. 62(2):443-449.
- Martínez-Picado, J., Blanch, A. R., Joffre, J. Rapid detection and identification of *Vibrio anguillarum* by using a specific oligonucleotide probe complementary to 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology. 1994. 60:732-737.
- Martins, M.L., Mouriño, J.L., Amaral, G.V., Vieira, F.N., Dotta, G., Jatobá, A.M.B., Pedrotti, F.S., Jeronimo, G.T., Buglione-Neto, C.C., Pereira, J.G. Haematological changes in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. Brazilian Journal of Biology. 2008. 68(3):631-637.
- Martins, M.L., Tavares-Dias, M., Fujimoto, R.Y., Onaka, E.M., Nomura, D.T. Haematological alterations of *Leporinus macrocephalus* (Osteichthyes: Anostomidae) naturally infected by *Goezia leporini* (Nematoda: Anisakidae) in fish pond. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2004. 56(5):640-646.
- Masumura, K., Wakabayashi, H. An outbreak of gliding bacterial diseases in hatcheryborn red sea bream (*Pagrus major*) and gilthead sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*) fry in Hiroshima. Fish Pathology. 1977. 12:171-177.

- McCaffrey, R.I., Allen, L.A. *Francisella Tularensis* LVS evades killing by human neutrophils via inhibition of respiratory burst and phagosome escape. *Journal of Leukocyte Biology*. 2006. 80:1224-1230.
- McVicar A.H. Pancreas disease of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* in Scotland: epidemiology and early pathology. *Aquaculture*. 1987. 67:71-78.
- McVicar, A.H., White, P.G. The prevention and cure of an infectious disease in cultivated juvenile Dover sole *Solea solea* (L.). *Aquaculture*. 1982. 26:213-222.
- McVidar, A.H., White, P.G. Fin and skin necrosis of Dover sole *Solea solea* (L.). *Journal of Fish Diseases*. 1979. 2:557-562.
- Michel, C., Faivre, B. Occurrence and significance of agglutinating antibodies in experimental furunculosis of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal Fish Diseases*. 1982. 5:429-432.
- Midtlyng, P.J. Vaccination against furunculosis. En: *Furunculosis in Fish: A Multidisciplinary Review*. Eds.: Bernoth, E.-M., Ellis, A. E., Midtlyng, P. J., Olivier, G., Smith, P. Academic Press, London. 1997. 382-404
- Mikkelsen, H., Lund, V., Larsen, R., Seppola, M. Vibriosis vaccines based on various serogroups of *Vibrio anguillarum* O2 induce specific protection in Atlantic cod (*Gadus morhua*, L.) juveniles. *Fish Shellfish Immunology*. 2011. 30:330-339.
- Miyata, M.A., Aoki, T., Inglis, V., Yoshida, T., Endo, M. RAPD analysis of *Aeromonas salmonicida* and *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Applied Bacteriology*. 1995. 79(2):181-185.
- Morgan, J.A., Pottinger, T.G., Rippon, P. Evaluation of flow cytometry as a method for quantification of circulating blood cell population in salmonid fish. *Journal Fish Biology*. 1993. 42:131-141.
- Moriñigo, M.A., Romalde, J.L., Chabrillon, M., Magariños, B., Arujo, S., Balebona, M.C., A. E. Toranzo. Effectiveness of a divalent vaccine for gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) against *Vibrio alginolyticus* and *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathology*. 2002. 22:298-303.
- Moyner, K. Changes in serum protein composition in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., during *Aeromonas salmonicida* infection. *Journal and Fish Diseases*. 1993. 16:601-604.
- Muroga, K. Studies on *Vibrio anguillarum* and *V. anguillicida* infections. *Journal of the Faculty of Fisheries and Animal Husbandry, Hiroshima University*. 1975. 14:101-205.
- Muroga, K., Iida, M., Matsumoto, H., Nakai, T. Detection of *Vibrio anguillarum* from waters. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*. 1986. 52:641-647.
- Muroga, K., Yamanoi, H., Hironaka, Y., Yamamoto, S., Tatani, M., Jo, Y., Takahashi, S., Hanada, H. Detection of *Vibrio anguillarum* from wild fingerlings of ayu *Plecoglossus alvelis*. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*. 1984. 50:591-596.

- Myhr, E., Larsen, J.L., Lillehaug, A., Gudding, R., Heum, M., Håstein, T. Characterization of *Vibrio anguillarum* and closely related species isolated from farmed fish in Norway. *Applied and Environmental Microbiology*. 1991. 57(9):2750-2757.
- Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*. 1997. 88:355-365.
- Nakajima, M., Chikahata, H. Efficacy of oral and hyperosmotic vaccinations for vibriosis in ayu. *Fish Pathology*. 1979. 14:9-13.
- Nakanishi, T., Toda, H., Shibasaki, Y., Somamoto, T. Cytotoxic T cells in teleost fish. *Developmental and comparative immunology*. 2011. 35(12):1317-23.
- Newman, S. G. Bacterial vaccines of fish. *Annual Review of Fish Diseases*. 1993. 3:145-186.
- Nielsen, M.E., Esteve-Gassent, M.D. The eel immune system: present knowledge and the need for research. *Journal Fish Diseases*. 2006. 29(2):65-78.
- Nishibuchi, M., Muroga, K. Pathogenic *Vibrio* isolated from cultured eels. III. NaCl tolerance and flagellation. *Fish Pathology*. 1977. 12:87-92.
- Norqvist, A., Hagstrom, A., Wolf-Watz, H. Protection of rainbow trout against vibriosis and furunculosis by the use of attenuated strains of *Vibrio salmonicida*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1989. 55:1400-1405.
- O'hici, B., Olivier, G., Powell, R. Genetic diversity of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* demonstrated by random amplified polymorphic DNA and pulsed-field gel electrophoresis analyses. *Diseases Aquatic Organisms*. 2000. 39:109-119.
- Osorio, C.R., Collins, M.D., Toranzo, A.E., Baja, J.L., Romalde, J.L. 16s rRNA gene sequence analysis of *Photobacterium damsela* and nested PCR method for rapid detection of the causative agent of fish pasteurellosis. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999. 65:2942-2946
- Ostland, V.E., LaTrace, C., Morrison, D., Ferguson, H.W. *Flexibacter maritimus* associated with a bacterial stomatitis in Atlantic salmon smolts reared in net-pens in British Columbia. *Journal of Aquatic Animal Health*. 1999. 11:35-44.
- Palaksha, K.J., Shin, G.W., Kim, Y.R., Jung, T.S. Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish and Shellfish Immunology*. 2008. 24(4):479-88.
- Park, S.U., Kwon, M.G., Lee, Y.H., Shin, I.S., Min, S.M. Effects of supplemental Undaria, obosan and wasabi in the experimental diets on growth, body composition, blood chemistry and non-specific immune response of juvenile flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Journal Aquaculture*. 2003. 16:210-215.
- Parry, R.M., Chandan, R.C., Shahani, K.M. A Rapid and Sensitive Assay of Muramidase. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1965. 119(2):384-6.

- Paterson, W.D., Fryer, J.L. Effect of temperature and antigen dose on the antibody response of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) to *Aeromonas salmonicida* endotoxin. Journal of the Fisheries Research Board of Canada. 1974. 32:1743-1749.
- Pathiratne, A., Rajapakshe, W. Hematological changes associated with epizootic ulcerative syndrome in the Asian cichlid fish, *Etroplus suratensis*. Asian Fisheries Science Journal. 1998. 11(3-4):177-316.
- Pazos, F. *Flexibacter maritimus*: estudio fenotípico, inmunológico y molecular. 1997. Tesis Doctoral Universidad Santiago de Compostela.
- Pazos, F., Santos, Y., Macias, A.R., Núñez, S., Toranzo, A.E. Evaluation of media for the successful culture of *Flexibacter maritimus*. Journal and Fish Diseases. 1996. 19:193-197.
- Pazos, F., Santos, Y., Núñez, S., Toranzo, A.E. Increasing occurrence of *Flexibacter maritimus* in the marine aquaculture of Spain. FHS/AFS Newsl. 1993. 21:1-2.
- Pelletier N. Going organica new wave in aquaculture. AAC. Spec Pub. 2004. 8.
- Penagos, G., Barato, P., Iregui, C. Immune System And Vaccination In Fish. Acta biológica Colombiana. 2009. 14(1):3-24.
- Pettersen, E.F., Bjerknes, R., Wergeland, H.I. Studies of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) blood, spleen and head kidney leucocytes using specific monoclonal antibodies, immunohistochemistry and flow cytometry. Fish and Shellfish Immunology. 2000. 10(8):695-710.
- Pillay, T.V.R. Acuicultura: principios y prácticas. Limusa. México. 1997.
- Piñeiro Vidal, M., Riaza A., Santos, Y. *Tenacibaculum discolor* sp. nov. and *Tenacibaculum gallaicum* sp. nov., isolated from sole (*Solea senegalensis*) and turbot (*Psetta maxima*) culture systems. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2008a. 58:21-25.
- Piñeiro-Vidal, M., Centeno-Sestelo, G., Riaza, A., Santos, Y. Isolation of pathogenic *Tenacibaculum maritimum* related organism from diseased turbot and sole cultured in the Northeast of Spain. Fish pathology. 2007. 27(1):29.
- Piñeiro-Vidal, M., Carballas, C.G., Riaza, A., Santos, Y. *Tenacibaculum soleae* sp. nov. isolated from diseased sole (*Solea senegalensis* Kaup). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2008b. 58(4):881-885.
- Piñeiro-Vidal, M., Gijón, D., Zarza, C., Santos, Y. *Tenacibaculum dicentrarchi* sp. nov. a marine bacterium of the family *Flavobacteriaceae* isolated from European sea bass. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2012. 62:425-429.
- Pirarat, N., Maita, M., Endo, M., Katagiri, T. Lymphoid apoptosis in *Edwardsiella tarda* septicemia in tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish and Shellfish Immunology. 2007. 22:608-616.

- Post, G. A preliminary report on the use of nitrofurans compounds for furunculosis of trout, with special emphasis on furoxone. Program Fish- Culturing journal. 1959. 21(1):30-33.
- Pradipta, R.R., Nayak, B., Das, S. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms. Immunology letters. 2012. 148(1):23-33.
- Pulido E, Iregui C, Figueroa J, Klesius P. Estreptococosis en tilapias (*Oreochromis spp.*) cultivadas en Colombia. Revista Aquatic. 2004. 20:97-106.
- Raida, M.K., Buchmann, K. Temperature dependent expression of immune relevant genes in rainbow trout following *Yersinia ruckeri* vaccination. Diseases of Aquatic Organisms. 2007. 77(1):41-52.
- Real, F., Acosta, B., Deniz, S., Oros, J., Rodriguez, E. *Aeromonas salmonicida* infection in *Sparus aurata* in the Canaries. Bulletin of the European Association of Fish. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists. 1994. 14(5):153-155
- Rehnstarn, A.S., Norqvist, A., Wolf-Watz, H., Hagstroin, A. Identification of *Vibrio anguillarum* in fish by using partial 16S rRNA sequences and a specific 16S rRNA oligonucleotide probe. Applied and Environmental Microbiology. 1989. 55:1907-1910.
- Rehulka, J. *Aeromonas* causes severe skin lesions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): clinical pathology, haematology and biochemistry. Acta Veterinaria Brunensis. 2002. 71:351-360.
- Reichenbach, H., Kohl, W., Böttger-Vetter, A., Achenbach, H. Flexirubin-type pigments in *Flavobacterium*. Archives of Microbiology. 1980. 126:291-293.
- Reis, M.I.R., Nascimento, D.S., Vale, A.D., Silva, M.T., Dos Santos, N.M.S. Molecular cloning and characterisation of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) caspase-3 gene. Molecular Immunology. 2007a. 44:774-783.
- Reis, M.I.R., Vale, A.D., Pinto, C., Dos Santos, N.M.S. First molecular cloning and characterisation of caspase-9 gene in fish and its involvement in a Gram negative septicemia. Molecular Immunology. 2007b. 44(7):1754-64.
- Rohovec, J., Garrison R. L., Fryer, J. L. Immunization of fish for the control of vibriosis. In Proceedings of the third U.S. Japan meeting on aquaculture. Tokio. Fisheries Agency . Government and Japan Sea Regional Fisheries. Research Laboratory. 1975. 105-112.
- Romestand, B., Dragesco, A., Breuil, G., Coste, F., Bouix, G. An ELISA technique for rapid diagnosis of vibriosis in sea bass *Dicentrarchus labrax*. Diseases of Aquatic Organisms. 1993. 12:137-143.
- Rose, A.S., Ellis, E.E., Munro, A.L.S. The survival of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in seawater. Journal and Fish Diseases. 1990. 13:205-214.

- Rosenberg-Wiser, S., Avtalion, R.R. The cells involved in the immune response of fish. III. Culture requirements of PHA-stimulated carp (*Cyprinus carpio*) lymphocytes. *Developmental and Comparative Immunology*. 1982. 6:693-702.
- Rottmann, R.W., Francis-Floyd, R. and Durborow R. The role of stress in fish disease. Southern Regional Aquaculture Center. 1992. N°474.
- Sakai, M., Atsuta, S., Kobayashi, M., Kawakami, H., Yoshida, T. The cell surface hydrophobicity and hemagglutinating properties of the bacterial fish pathogen, *Pasteurella piscicida*. *Bulletin. European Association of Fish Pathologists*. 1993a. 13:168-170.
- Sakai, M., Atsuta, S., Kobayashi, M. The immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) injected with five *Renibacterium salmoninarum* bacterins. *Aquaculture*. 1993b. 113: 11-18.
- Sakai, M. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*. 1999. 172:63-92.
- Samuelsen, O., Nerland, A., Jogensen, T., Bjorgan Schroder, T. Svåsand, T. Børgh, Ø. Viral and bacterial diseases of Atlantic cod *Gadus morhua*, their prophylaxis and treatment: a review. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2006. 71:239-254.
- Santarém, M.M., Novoa, B., Figueras, A. Effects of β -glucans in the non specific immune responses of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish Shellfish Immunol*. 1997. 7:429-437.
- Santos, Y., Pazos, F., Bandín, I., Toranzo, A.E. Analysis of antigens present in the extracellular products and cell surface of *Vibrio anguillarum* serotypes O1, O2 and O3. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995. 61:2493-2498.
- Santos, Y. Principales enfermedades bacterianas en la piscicultura ibérica: diagnóstico y vacunación. En: *Inmunología e Inmunopatología en piscicultura*. (Chaves Pozo, E., García Ayala, A., Meseguer Peñalver, Eds). 2005. 9:127-153.
- Santos, Y., Bandín, I., Núñez, S., Gravningen, K., Toranzo, A. E. Protection of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Richardson), against vibriosis using two different vaccines. *Journal of Fish Diseases*. 1991. 14:407-411.
- Santos, Y., Pazos, F., Barja, J. L. *Flexibacter maritimus*, causal agent of flexibacteriosis in marine fish. En: Oliver G (ed.), *ICES Identification Leaflets for diseases and parasites of fish and shellfish*, No. 55. International Council for the Exploration of the Sea, Copenhagen, Denmark. 1999. 1-6.
- Santos, Y., Pazos, F., Toranzo, A.E. Biochemical and serological analysis of *Vibrio anguillarum* related organisms. *Disease of Aquatic Organisms*. 1996. 26:67-73.
- Santos, Y., Toranzo, A.E., Barja, J.L., Nieto, T.P., Villa, T.G. Virulence properties and enterotoxin production of *Aeromonas* strains isolated from fish. *Infection and Immunity*. 1988. 56:3285- 3293.

- Santos, Y., Pazos, F., Nuñez, S., Toranzo, A.E. Antigenic characterization of *Vibrio anguillarum* related organisms isolated from turbot and cod. *Diseases of aquatic organisms*. 1997. 28:45-50.
- Saurabh, S., Sahoo, P.K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research*. 2008. 39:223-239.
- Secombes, C. J. The non-specific immune system:cellular defenses. The fish Immune system: Organisms, pathogen and environment. En: Iwawa, G., Nakanishi, T. eds. Academic Press, San Diego, USA. 1996. 63-103.
- Secombes, C.J. Enhancement of fish phagocyte activity. *Fish and Shellfish Immunology*. 1994. 4:421-436.
- Secombes, C.J., Wang, T. The innate and adaptive immune system of fish. *Infectious Disease in Aquaculture*. 2012. 3-68.
- Sepulcre, M.P., Sarropoulou, E., Kotoulas, G., Meseguer, J., Mulero, V. *Vibrio anguillarum* evades the immune response of the bony fish sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) through the inhibition of leukocyte respiratory burst and down-regulation of apoptotic caspases. *Molecular Immunology*. 2007. 44(15):3751-7.
- Shailesh, S., Sahoo, P.K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research*. 2008. 39(3):223-239.
- Shao, Z.J. Aquaculture pharmaceuticals and biologicals: current perspective and future possibilities. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001. 50:229-243.
- Shoemaker, C.A., Klesius, P.H. Streptococcal diseases problems and control: a review. En: Fitzsimmons K. *Tilapia Aquaculture*. Proc. Fourth international symposium on tilapia in aquaculture. Florida. USA. 1997. 2:671-680.
- Silva, B. S., Martins, M.L., Jatobá, A., Buglione Neto, C.C., Vieira, F.N., Pereira, G.V. Jerônimo, G.T., Seiffert, W.Q., Mourinho, J.L.P. Respostas hematológicas e imunológicas de la tilapia del Nilo después de la administración de vacunas polivalentes por diferentes rutas. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 2009. 29(11).
- Sitjà-Bobadilla, A. Living off a fish: a trade-off between parasites and the immune system. *Fish and Shellfish Immunology*. 2008. 25:358–372.
- Sitjà-Bobadilla, A., Alvarez-Pellitero, P. Experimental transmission of *Cryptosporidium molnari* (Apicomplexa: Coccidia) to gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Parasitology Research*. 2003. 91:209-214.
- Siwicki, A., Studnicka, M. The phagocytic ability of neutrophils and serum lysozyme activity in experimentally infected carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish Biology*. 1987. 31,57-60.
- Skov, J., Kania, P.W., Holten-Andersen, L., Fouz, B., Buchmann, K. Immunomodulatory effects of dietary β -1,3-glucan from *Euglena gracilis* in rainbow trout (*Oncorhynchus*

- mykiss*) immersion vaccinated against *Yersinia ruckeri*. Fish and Shellfish Immunology. 2012. 33(1):111-20.
- Smith, J.A., Weidemann, M.J. Further characterization of the neutrophil oxidative burst by flow cytometry. Journal Immunology Methods. 1993. 18;162(2):261-8.
- Smith, P. D. Vaccination against vibriosis. En: Ellis AE (ed) Fish vaccination. Academic Press Ltd, London. 1988. 67–84.
- Smolewski, P., Bedner, E., Du, L., Hsieh, T.C., Wu, J.M., Phelps, D.J., Darzynkiewicz, Z. Detection of caspase activation by fluorochrome-labeled inhibitors: multiparameter analysis by laser scanning cytometry. Cytometry 2001. 44:73-83.
- Snieskco, S. F. Ulcer disease in brook trout (*Salvelinus fontinalis*): its economic importance, diagnosis, treatment, and prevention. Program Fish Culturist. 1952. 14(2):43-49.
- Soltani, M., Burke, C.M. Responses of fish pathogenic *Cytophaga/ Flexibacter* like bacteria (CFLB) to environmental conditions. Bulletin- European Association of Fish Pathologists. 1994. 14:185–187.
- Soltani, M., Shanker, S., Munday, B.L. Chemotherapy of *Cytophaga/ Flexibacter* like bacteria (CFLB) infections in fish: Studies validating clinical efficacies of selected antimicrobials. Journal of Fish Diseases. 1995. 18:555-565.
- Soltani, M., Munday, B.L., Burke, C.M. . The relative susceptibility of fish to infections by *Flexibacter columnaris* and *Flexibacter maritimus* Aquaculture. 1996. 140:259-264.
- Sommerset, I., Krossoy, B., Biering, E., Frost, P. Vaccines for fish in aquaculture. Expert Review of Vaccines. 2005. 4(1):89-101.
- Sorensen, U. B. S., Larsen, J. L. Serotyping of *Vibrio anguillarum*. Applied and Environmental Microbiology. 1986. 51:593-597.
- Srinivasa Rao, P.S., Lim, T.M., Leung, K.Y. Opsonized virulent *Edwardsiella tarda* strains are able to adhere to and survive and replicate within fish phagocytes but fail to stimulate reactive oxygen intermediates. Infection and immunity. 2001. 69:5689-5697.
- Stave, J.W., Roberson, B.S., Hetrick, F.M. Chemiluminescent responses of striped bass, *Morone saxatilis* (Mialbaum), phagocytes to *Vibrio spp*. Journal of Fish Diseases. 1985. 8:479-483.
- Steinar, P., Engstad, R., Robertsen, B. Enhanced lysozyme production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages treated with yeast glucan and bacterial lipopolysaccharide. Fish and Shellfish Immunology. 2001. 11(1):23-37.
- Stosik, H., Deptula, W., Travnick, M. Studies on the number and ingesting ability of thrombocytes in sick carps (*Cyprinus carpio*). Veterinary Medicine. 2001. 46:12-16.

- Stosik, M., Baldy-Chudzik, K., Deptula, W., Wiktorowicz, K., Travnicek, M. Respiratory burst in neutrophilic granulocytes of carps (*Cyprinus carpio*): cytometric studies. *Veterinarni Medicina UZPI*. 2002. 47(1):17-20.
- Strohl, W. R., Tait, L. R. *Cytophaga aquatilis* sp. nov., a facultative anaerobe isolated from the gills of freshwater fish. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1978. 28:293-303.
- Tafalla, C., Figueras, A., Novoa, B. Viral hemorrhagic septicemia virus alters turbot *Scophthalmus maximus* macrophage nitric oxide production. *Disease of Aquatic Organism*. 2001. 47:101–107.
- Tafalla, C., Novoa, B. Requirements for nitric oxide production by teleost fish head kidney macrophages. *Developmental and Comparative Immunology*. 2000. 24(6-7):623-631.
- Tajima, K., Ezura, Y., Kmura, T. Distribution of *Vibrio anguillarum* in Otsuchi Bay as fish culture environments. *Fish Pathology*. 1988. 23:95-103.
- Tatner, M. F. The ontogeny of humoral immunity in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1986. 12:93-105.
- Tatner, M. F., Horne, M. T. Susceptibility and immunity to *Vibrio anguillarum* in post-hatching rainbow trout fry, *Salmo gairdneri* Richardson 1836. *Developmental and Comparative Immunology*. 1983. 7(3):465-472.
- Tebbit, G. L., Goodrich, T. D. Vibriosis and the development of bacterins for its control. En: Anderson D. P., Dorson, M., Dubourget, P. (eds): *Les antigenes des micro-organismes pathogenes des poissons*, Collection Fondation Marcel Merieux. 1982. 201-222.
- Thompson, F.L, Thompson, C.C.M. Dias, G., Naka, H. Dubay C., Crosa J. The genus *Listonella* MacDonell and Colwell 1986 is a later heterotypic synonym of the genus *Vibrio* *Pacini* 1854 (Approved Lists 1980) a taxonomic opinión. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2011. 61:3023–3027.
- Toranzo, A. E., Romalde, J.L., Magariños, B., Barja, J.L. Present and future aquaculture vaccines against fish bacterial diseases. *Op Méditerr*. 2009. 86:155-76.
- Toranzo, A.E., Barja, J.L. First report of furunculosis in turbot reared in floating cages in northwest of Spain. *Bulletin- European Association of Fish Pathologists*. 1992. 12:147-149.
- Toranzo, A.E., Barja, J.L., Hetrick, F.M. Survival of *Vibrio anguillarum* and *Pasteurella piscicida* in estuarine and fresh waters. *Bulletin European Association of Fish Pathologists*. 1982. 3:43-45.
- Toranzo, A.E., Baya, A.M., Roberson, B.S., Barja, J.L., Grimes, D.J., Hetrick, F.M. Specificity of slide agglutination test for detecting bacterial fish pathogens. *Aquaculture*. 1987. 61:81-97.

- Toranzo, A.E., Santos Y., Nuñez, S., Barja J.L. Biochemical and serological characteristics, drug resistance and plasmid profiles of Spanish isolates of *Aeromonas salmonicida*. Fish Pathology. 1991. 26:55-60.
- Toranzo, A.E., Santos, Y., Barja, J. L. Immunization with bacterial antigens: *Vibrio* infections. En: R. Gudding, A. Lillehaug, P.J. Midtlyng and F. Brown (eds), Fish Vaccinology. Karger, Basel, Switzerland. 1997. 93-105.
- Toranzo, A., Magariños, B., Romalde, J. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. Aquaculture. 2005. 246:37-61.
- Tort, L. Balasch, J.C., Mackenzie, S. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. Immunología. 2003. 22(3):277-286.
- Toyama, T., Kita-Tsukamoto, K., Wakabayashi, H. Identification of *Flexibacter maritimus*, *Flavobacterium branchiophilum* and *Cytophaga columnaris* by PCR targeted 16S ribosomal DNA. Fish Pathology. 1996. 31:25-31.
- Udey, L.R. A differential medium for distinguishing Alrf from Alr- phenotypes in *Aeromonas salmonicida*. En: Proceedings of the 13th Annual Conference and Workshop and 7th Eastern Fish Health Workshop. International Association for Aquatic Animal Medicine, Baltimore, Maryland. 1982. 41.
- Udey, L.R., Fryer, J.L. Immunization of fish with bacterins of *Aeromonas salmonicida*. Marine Fisheries Review. 1978. 40:12-17.
- Urbanczyk, H., Ast, J. C., Higgins, M. J., Carson, J., Dunlap, P.V. Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2007. 57:2823-2829.
- Urdaci, M.C., Marchand, M., Grimont, P.A. Characterization of 22 *Vibrio* species by gas chromatography analysis of their cellular fatty acids. Research in Microbiology. 1990. 141:437-452.
- Vale, A.D., Marques, F., Silva, M.T. Apoptosis of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) neutrophils and macrophages induced by experimental infection with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Fish and Shellfish Immunology. 2003. 15:129-144.
- Vale, A.D., Silva, M.T., Dos Santos, N.M.S., Nascimento, D.S., Reis-Rodrigues, P., Costa-Ramos, C., Ellis, A.E., Azevedo, J.E. AIP56, a novel plasmid-encoded virulence factor of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* with apoptogenic activity against sea bass macrophages and neutrophils. Molecular Microbiology. 2005. 58(4):1025-1038.
- Van Gelderen, R., Carson, J., Nowak, B. Experimental vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against marine flexibacteriosis. Aquaculture. 2009. 288(1-2):7-13.

- Van Muiswinkel, W.B. The piscine immune system: Innate and Acquired immunity. En: Fish Diseases and Disorders I: Protozoan and Metazoan Infections". P. T.K. Woo (Editor), CAB International, Wallingford, UK. 1995. 17:729-750.
- Vaughan, L.M., Smith, P., Foster, T.J. An aromatic-dependent mutant of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* is attenuated in fish and is effective as a live vaccine against the salmonid disease furunculosis. *Infection and Immunity*. 1993. 61:2172-2181.
- Villamil, L., Figueras, A., Aranguren, R. Novoa, B. Non-specific immune response of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), experimentally infected with a pathogenic *Vibrio pelagius*. *Journal of Fish Diseases*. 2003. 26(6):321-9.
- Villamil, L., Tafalla, C., Figueras, A., Novoa, B. Evaluation of immunomodulatory effects of lactic acid bacteria in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2002. 9:1318-1323.
- Wakabayashi, H., Hikida, M., Masumura, K. *Flexibacter* infection in cultured marine fish in Japan. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*. 1984. 37:587-593.
- Wakabayashi, H., Hikida, M., Masumura, K. *Flexibacter maritimus* sp. nov., a pathogen of marine fishes. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1986. 36:396-398.
- Warsen, A.E., Krug, M.K., LaFrentz, S., Stanek, D.R., Loge, F., Call, D.R. Simultaneous discrimination between 15 fish pathogens by using 16S ribosomal DNA PCR and DNA microarrays. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004. 70:4216-4221.
- Watts, M., Munday, B.L., Burke, C.M. Immune responses of teleost fish. *Australian Veterinary Journal*. 2001. 79:570-574.
- Wiklund, T. Atypical *Aeromonas salmonicida* isolated from ulcers of pike, *Esox lucius* L. *Journal and Fish Diseases*. 1990. 13:541-544.
- Wiklund, T., Bylund, G. A cytochrome oxidase negative bacterium (presumptively an atypical *Aeromonas salmonicida*) isolated from ulcerated flounders (*Platichthys flesus* (L.)) in the northern Baltic Sea. *Bulletin- European Association of Fish Pathologists*. 1991. 11:74-76.
- Wilson, T., Carson, J. Development of sensitive, high-throughput one-tube RT-PCR-enzyme hybridization assay to detect selected bacterial fish pathogens. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2003. 54:127-134.
- Wilson, T., Carson, J., Bowman, J. Optimization of one-tube PCR- ELISA to detect femtogram amounts of genomic DNA. *Journal of Microbiological Methods*. 2002. 51:163-170.
- Woese, C.R.I., Yang, D., Mandelco, L., Stelter, K.O. The *Flexibacter- Flavobacter* connection. *Systematic and Applied Microbiology*. 1990. 13:161-165.

- Woodland, R. European regulatory requirements for veterinary vaccine safety and potency testing and recent progress towards reducing animal use. *Procedia in Vaccinology*. 2011. 5:151-155.
- Yarahmadi, P., Kolangi Miandare, H., Fayaz, S.C. Increased stocking density causes changes in expression of selected stress- and immune-related genes, humoral innate immune parameters and stress responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology*. 2016. 48:43-53.
- Zhivotovsky, B., Orrenius, S. Current. Determination of apoptosis and necrosis. En: Wiley, J. & Sons (eds). *Current Protocols in Cell Biology*. USA: Wiley InterScience. 2001. 0(1): 2.2.1- 2.2.34.
- Zorrilla, I., Arijó, S., Chabrillon, M., Díaz, P., Martínez-Manzanares, E., Balebona, M.C., Moriño, M.A. *Vibrio* species isolated from diseased farmed sole, *Solea senegalensis* (Kaup), and evaluation of the potential virulence role of their extracellular products. *Journal of Fish Diseases*. 2003. 26:103-108.
- Zou J., Secombes CJ. The Function of Fish Cytokines. *Biology*. 2016. 5:23.

